

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION " PHARMACIE "

PAR

Claude-Georges BLIN

PHARMACIEN

Ex-Moniteur de Chimie Biologique

Diplômé d'Etudes supérieures de Chimie biologique

Diplômé d'Etudes spéciales de Biochimie pharmaceutique et technique

Diplômé d'Etudes spéciales de Sérologie

Diplômé d'Hématologie

Né le 14 Octobre 1933 à MÉZIÈRES (Ardennes)

AFFINITÉS DE L'ION FERRIQUE POUR DES SUBSTRATS BIOLOGIQUES COMPARAISON AVEC D'AUTRES CATIONS

Soutenue le 12 Mars 1962 devant la Commission d'Examen

Président Mlle BESSON, Professeur

Juges { M. le Doyen KAYSER
M. PIERFITTE, Maître de Conférences agrégé

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547403_0017

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy
MENTION " PHARMACIE "

PAR

Claude-Georges BLIN

PHARMACIEN

Ex-Moniteur de Chimie Biologique
Diplômé d'Etudes supérieures de Chimie biologique
Diplômé d'Etudes spéciales de Biochimie pharmaceutique et technique
Diplômé d'Etudes spéciales de Sérologie
Diplômé d'Hématologie

Né le 14 Octobre 1933 à MÉZIÈRES (Ardennes)

AFFINITÉS DE L'ION FERRIQUE POUR DES SUBSTRATS BIOLOGIQUES COMPARAISON AVEC D'AUTRES CATIONS

Soutenue le 12 Mars 1962 devant la Commission d'Examen

Président Mlle BESSON, Professeur
Juges { M. le Doyen KAYSER
 M. PIERFITTE, Maître de Conférences agrégé

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION "PHARMACIE"

PAR

Claude-Georges BLIN

ARMANIEN

La Faculté de Pharmacie de Nancy

Après avoir examiné le rapport de la Commission d'admission et les épreuves de la thèse, a admis le candidat à la soutenance de sa thèse.



N° 14-15-16-17-18-19-20-21-22-23-24-25-26-27-28-29-30-31-32-33-34-35-36-37-38-39-40-41-42-43-44-45-46-47-48-49-50-51-52-53-54-55-56-57-58-59-60-61-62-63-64-65-66-67-68-69-70-71-72-73-74-75-76-77-78-79-80-81-82-83-84-85-86-87-88-89-90-91-92-93-94-95-96-97-98-99-100

ACTIVITÉS DE L'ION FERRIQUE POUR DES SUBSTRATS BIOLOGIQUES
COMPARAISON AVEC D'AUTRES CATIONS

Soutenue le 17 Mars 1953 devant la Commission d'Examen

Président : M. BESSON, Professeur
M. le Docteur KAYSER
M. FIEBETTE, Maître de Conférences adjoint

FACULTE DE PHARMACIE
UNIVERSITE DE NANCY

ADMINISTRATION

DOYEN

Professeur : F. KAYSER

ASSESEUR

Professeur : A. MEUNIER

SECRETAIRE PRINCIPAL

B. SEUROT

Personnel enseignant

Professeurs

M.	MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Melle	FRANCOIS M. Th.	Matière médicale
MM.	KAYSER F.	Chimie
	FRANQUET R.	Botanique
	MARCHAL J.G.	Microbiologie
	STEIMETZ E.	Sciences naturelles
	BLOCH J.M.	Toxicologie
	SOLEIL J.	Pharmacie chimique
	BERNANOSE A.	Physique
Melle	BESSON S.	Pharmacodynamie

Maîtres de conférences-Agrégés

MM.	BENE R.	Microbiologie
	MIRJOLET M.	Sciences physicochimiques
	PIERFITTE M.	Chimie biologique
	PELT J.M.	Matière médicale
	ROBBA M.	Chimie organique

Chargés de cours complémentaires

M.	MEUNIER A.	Hydrologie
Melle	FRANCOIS M. Th.	Hygiène
MM.	KAYSER F.	Biochimie technique
	FRANQUET R.	Cryptogamie
	MARCHAL J.G.	Parasitologie

MM. STEIMETZ E.
BLOCH J.M.
SOLEIL J.
BERNANOSE A.
GRANGER (Professeur à la
Faculté de Droit)

Mycologie-Minéralogie
Chimie minérale
Chimie organique
Optique et acoustique
Déontologie

Melle BESSON S.

Techniques spéciales et
méthodes modernes d'analyse
Bactériologie
Caractères analytiques des
sels

MM. BENE R.
ANZIANI P.

Mme LASSEUR A.

Techniques spéciales d'ana-
lyses bactériologiques
Chimie analytique
C.E.S. Chimie biologique
Matière médicale

MM. MIRJOLET M.
PIERFITTE M.
Melle HEINRICH S.

Chefs de travaux

M. ANZIANI P.
Mme LASSEUR A.
MM. VILIOUTREIX J. (stagiaire)
MARTIN J.A. (délégué)
Melle GIRARD Th. "
M. GAULTIER J. "
M. SIEST G. "
Melle HEINRICH S. (stagiaire)

Chimie
Microbiologie-Parasitologie
Micrographie
Chimie
Microbiologie technique
Physique
Chimie biologique
Sciences pharmaceutique

Doyen honoraire : M. RICHARD, Recteur de l'Académie de Montpellier

Professeurs honoraires : M. CORDEBARD - M. DOURIS

A notre Président de Thèse,

Mademoiselle S. BESSON

Professeur de Pharmacodynamie

Elle nous a communiqué son enthousiasme
pour la biologie et fait partager
beaucoup de ses connaissances.

Elle nous a donné le sujet de ce travail
et nous a tant aidé à le mener à bien.

Qu'elle trouve ici l'expression de nos
sincères remerciements, de notre immense
reconnaissance et de notre profond respect.

A nos Juges

Monsieur le Doyen F.KAYSER
Professeur de Chimie

En reconnaissance de l'enseignement reçu,
de son accueil bienveillant et de ses
conseils judicieux.

Nous le prions d'accepter le témoignage
de notre profond respect et de notre
gratitude.

Monsieur M. PIERFITTE
Maître de conférences agrégé

Qui a guidé nos premiers pas de biologiste,
qui nous a donné l'exemple d'un travail
conscientieux et d'une recherche patiente.

Qu'il trouve ici nos remerciements sincères.

A Tous nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie de NANCY

Hommage respectueux et reconnaissant

A ceux qui nous ont aidé dans ce travail :

Nos amis

Tous les travailleurs du laboratoire de
Pharmacodynamie

Nous les remercions vivement de l'aide
qu'ils nous ont tous apportée, de
l'ambiance de sympathie qu'ils ont créée.

A mes Grands Parents

A mes Parents

En modeste témoignage de reconnaissances
et d'affection

A ma famille

La plus grande partie de notre travail a été terminée à la fin de l'année 1958, c'est-à-dire il y a 3 ans. Les obligations militaires ont retardé sa mise au point. Nous avons, depuis cette époque, complété ces recherches et surtout nous avons tenu compte des publications parues pendant ces 3 dernières années, dans notre rédaction et dans nos interprétations.

Introduction

1ère Partie - COMPORTEMENT DU FER VIS-A-VIS DE L'HEMATIE

A - 1'HEMATIE

- 1 - Biométrie de 1'érythrocyte vivant
- 2 - Structure
- 3 - Constituants protéiques
- 4 - Fer non hémoglobinique

B - PROTOCOLE DES ESSAIS DE FIXATION METALLIQUE SUR LES HEMATIES

C - DOSAGE DU FER

D - RECHERCHE DES DIVERS SELS DE FER POSSEDANT UNE ACTION SUR LES HEMATIES

- 1 - Le sulfate ferreux ammoniacal
- 2 - Le citrate de fer ammoniacal
- 3 - Le chlorure ferrique
- 4 - Le sulfate ferrique ammoniacal

E - COMPARAISON DES EFFETS MACROSCOPIQUES DU FER ET DE QUELQUES AUTRES METAUX SUR LES HEMATIES

- 1 - Effets directs des sels métalliques sur les hématies
- 2 - Intervention des sels métalliques dans 1'hémolyse provoquée par d'autres agents.
- 3 - Essai d'interprétation

F - FIXATION DU FER SUR LES HEMATIES

- 1 - Variation de la quantité de fer fixé en fonction de sa concentration.
- 2 - Variation de la quantité de fer fixé en fonction de la quantité de fer.

- 3 - Variation de la quantité de fer fixé en fonction du temps
- 4 - Variation de la quantité de fer fixé en fonction de la température
- 5 - Variation de la quantité de fer fixé en fonction de l'agitation
- 6 - Variation de la quantité de fer fixé en fonction du nombre des hématies
- 7 - Variation de la quantité de fer et de cuivre fixés en fonction de la tonicité du milieu.

G - RECHERCHE D'UNE COMPETITION ENTRE METAUX DANS LEUR FIXATION SUR LES HEMATIES

- 1 - Recherche d'une compétition entre le fer et le cuivre
- 2 - Recherche d'une compétition entre le cuivre et le zinc

H - DISSIMULATION DU FER PAR LES ACIDES AMINES ET PAR EDTA

- 1 - Dissimulation du fer par les acides aminés
- 2 - Dissimulation du fer par EDTA
 - a) dosage direct colorimétrique du complexe Fe^{+++} -EDTA
 - b) dosage colorimétrique du complexe Fe^{+++} -EDTA
 - c) dosage colorimétrique du fer dans le complexe Fe^{+++} -EDTA par l'o-phénanthroline

2ème Partie - ACTION DU FER SUR DIVERS TISSUS ET SUR DIVERS-PROTEIDES

A - FIXATION DU FER SUR LES TISSUS IN VITRO

B - ACTION DU FER SUR LA CONTRACTILITE DE L'IN-TESTIN ISOLE

C - COMPORTEMENT DU FER ET DE QUELQUES AUTRES
METAUX VIS-A-VIS DE CERTAINES PROTEINES
SANGUINES

- 1 - Action précipitante sur les protéines sériques
- 2 - Apport de l'électrophorèse dans l'étude de la liaison du fer aux protéines sériques
- 3 - Fixation du fer sur la sidérophiline
 - a) méthodes de dosages classiques
 - b) essai et mise au point d'une technique avec élimination du fer en excès par un carbonate
 - c) application au sérum sanguin
- 4 - Action sur la catalase
 - a) effets du fer et de différents métaux sur l'activité catalasique du sérum
 - b) influence de l'isoniazide sur les effets du fer, du cuivre et du zinc sur l'activité catalasique de l'hémoglobine.

RESUME ET CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

L'étude approfondie de l'action du cuivre sur les protéines sériques et sur les hématies par J. TAVERNIER (147) nous a incité à examiner le comportement d'autres ions métalliques et à comparer leurs affinités sur quelques substrats biologiques. Nous nous sommes spécialement intéressé à l'ion Fe pour deux raisons, l'une physico-chimique, l'autre biologique.

Les deux métaux, fer et cuivre, présentent une certaine analogie dans leurs caractères physico-chimique :

Dans le tableau de MENDELEJEFF le fer est placé dans la colonne VIII à côté du nickel et du cobalt, mais il est aussi un élément de transition et à ce titre il se rapproche du cuivre (58). L'ion cuivrique dont la structure électronique externe est $(n-1)d^9$ n'est pas à proprement parler un élément de transition mais il en a les caractères car la sous-couche $(n-1)d$ qui vient juste de se compléter à 10 électrons n'est pas très stable et peut encore mobiliser un ou deux électrons pour l'édification de liaisons chimiques.

Voici d'ailleurs quelques constantes des quatre ions métalliques Fe, Co, Ni, Cu :

	Fe	Co	Ni	Cu
Poids atomique	55,85	58,94	58,69	63,57
Nombre atomique	26	27	28	29
Volume atomique	7,1	6,8	6,6	7,1

On remarque que le fer et le cuivre ont le même volume atomique. Nous verrons qu'ils peuvent se remplacer dans des complexes biologiques (conalbumine, sidérophiline ...)

Au point de vue biologique non seulement le métabolisme du cuivre et celui du fer sont interdépendants, mais il existe une certaine similitude entre les deux affections résultant d'une accumulation dans l'organisme de chacun de ces métaux. La surcharge cuivrique apparaît dans la maladie de Wilson ou dégénérescence hépatolenticulaire, la surcharge ferrique dans l'hémochromatose ou cirrhose pigmentaire ; l'une et l'autre de ces retentions se traduisent par une atteinte hépatique grave. Une étude parallèle remarquable en a été faite par LANGE (91).

De la biologie du fer, dont l'ouvrage de J.C. DREYFUS et G. SHAPIRA (47) paru en 1958 donne une excellente vue d'ensemble,

nous ne ferons que rappeler succinctement le métabolisme et nous insisterons sur certaines combinaisons fer protéines dont l'étude a pu progresser depuis 1958.

Décrivons brièvement le métabolisme du fer après avoir énuméré les composés dans lesquels le fer est lié de façon spécifique ou non.

Dans un premier groupe de composés (hémoglobine, myoglobine, cytochromes, peroxydases, catalase) le fer est dit héminique, il se trouve à l'état ferreux au centre de la molécule, de protoporphyrine, lié aux 4 azotes pyrroliques dans le plan du cycle.

Un second groupe très disparate rassemble tout le fer non héminique : sidérophiline, ferritine, hémosidérine, fer non héminique musculaire ... Il semble à l'heure actuelle que ce fer non héminique joue dans la physiologie normale un rôle plus important qu'on ne l'avait cru jusqu'à présent.

Le fer décrit dans l'organisme un cycle presque fermé, les entrées sont réglées par les sorties normales ou accidentelles. Toute perte est compensée par une absorption duodénale plus forte, à condition que des ions ferreux se trouvent dans le tube digestif en quantité suffisante. L'acide chlorhydrique du suc gastrique joue un rôle essentiel dans l'ionisation du fer alimentaire ; le fer ne prendra plus jamais cette forme ionisée dans l'organisme.

L'absorption se fait au niveau des cellules muqueuses duodénales où le fer est associé à l'apoferritine pour former la ferritine. Ce fer est libéré au fur et à mesure des besoins dans le plasma pour se fixer sur la sidérophiline qui assure son transport dans l'organisme.

La sidérophiline transporte le fer soit vers les lieux d'utilisation, soit vers les lieux de réserve et peut aussi vraisemblablement transférer directement son fer aux réticulocytes (22) (112) (78)

Une partie de ce fer entre par la moëlle osseuse dans un nouveau cycle celui de l'hémoglobine.

L'autre partie est stockée dans le foie, la rate, la moëlle sous deux formes protéiques la ferritine et l'hémosidérine et dans le muscle sous une forme mal connue, mais vraisemblablement protéique.

Dans toutes ces formes le fer est à l'état trivalent.

Ce fer est susceptible de passer d'une protéine à une autre, de traverser une membrane cellulaire, mais ces passages requièrent sa transformation en fer ferreux. Ce peut être là l'oeuvre de substances réductrices en particulier de l'acide ascorbique et de la cystéine, mais aussi de processus mal définis.

Ainsi GRANICK (60) pensait que Fe^{++} rencontrait dans le sang une tension suffisante d' O_2 pour se transformer en Fe^{+++} et prendre probablement la forme hydroxyde qui s'attache avidement aux protéines. Mais il semble bien que le fer ne passe à l'état trivalent qu'au contact de la molécule qui se l'incorpore.

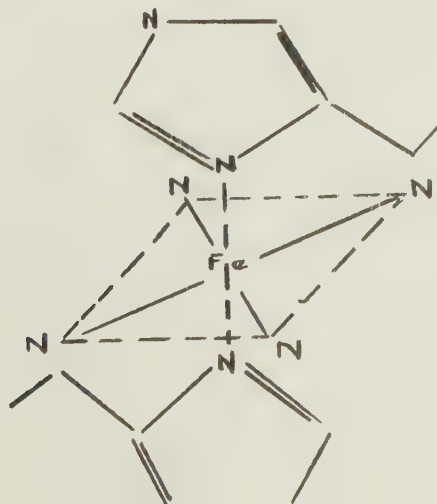
En ce qui concerne le fer de l'hémoglobine, après destruction des globules on le retrouve d'abord sous forme de granulations dans les cellules réticulaires qui ont digéré les hématies phagocytées, puis dans les mitochondries des érythroblastes où ils ont été transférés par un mécanisme analogue à la pinocytose. Il s'agit d'amas de ferritine comme on l'a montré par microscopie électronique (11) (12)

Les modes de liaison du fer dans ces formes biologiques sont variés. Nous nous arrêterons sur celles qui présentent le plus d'intérêt pour notre sujet.

HEMOGLOBINE

Dans l'hémoglobine la liaison du Fer, Fe^{++} , à l'hème résiste aux réactifs habituellement utilisés dans les dosages de fer (o-phé-
nanthroline, dipyridyle). Le fer ne peut donc pas être
révélé directement.

Quant à la liaison assurée par le fer entre l'hème et la globine, on pense en général qu'elle se fait par le groupement imidazol de l'histidine (26) (47).



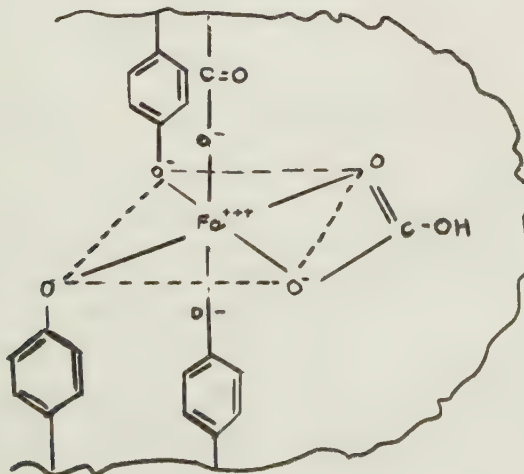
Il n'y a cependant pas de certitude. Il s'agirait peut-être de groupements carboxyliques (111) ou sulfhydriles (51) à moins qu'il n'y ait même qu'une liaison extrêmement faible, pratiquement inexistante, la constante de stabilité du complexe hème-globine étant voisine de zéro (51).

SIDEROPHILINE ET LACTOSIDEROPHILINE

Sidérophiline

La sidérophiline ou transferrine est une (β -globuline du plasma qui paraît se lier spécifiquement au fer in vivo. On a mis en évidence plusieurs transferrines, mais la plupart des individus n'en contiennent qu'une (59). Chaque molécule est capable de fixer deux atomes de fer trivalent. Chez le sujet normal un tiers seulement de la sidérophiline circulante est combiné au métal.

Le fer y est dissimulé à ses réactifs habituels. Il est lié de façon certaine à des groupements phénol et de façon probable à d'autres groupements (aminés par exemple). Comme la formation du complexe sidérophiline-fer nécessite la présence de bicarbonate, à raison de 1 CO_3H^- pour 1 Fe^{+++} , la liaison du fer paraît analogue à celle qui existe dans la conalbumine du blanc d'oeuf (156)



L'ensemble constitue un chélate de fer, la liaison de la protéine sérique avec Fe^{+++} augmente sa solubilité 10 fois, et confère une résistance plus grande aux traitements physiques et chimiques.

In vitro, une molécule de sidérophiline peut fixer deux atomes de fer (1,25 mg par g), deux atomes de cuivre (1,42 mg par g), du zinc, du manganèse, du cobalt (78).

Le mécanisme de transport du fer par la sidérophiline a été diversement expliqué. GRANICK (61) pensait que le fer, Fe^{++} , en équilibre avec la ferritine d'une part et le fer plasmatique d'autre part, passerait dans le courant sanguin où il s'oxyderait en hydroxyde. Cet hydroxyde serait adsorbé par les protéines. Cette interprétation semble à l'heure actuelle inexacte.

Une hypothèse plus récente (108) fait intervenir deux états de la sidérophiline : une forme circulante et une forme séquestrée dans les tissus, en particulier dans le foie et la moëlle. Ces tissus où le turnover de fer est élevé possèderaient des récepteurs spécifiques du fer en contact direct avec le plasma grâce à une circulation ouverte démontrée par les anatomistes. La sidérophiline pourrait y céder son fer.

Cette vue rejoindrait une opinion plus ancienne qui considèrerait que les capillaires étaient perméables à la sidérophiline, qui catabolisée par les cellules, y déposait son fer.

Une transferrine a été récemment mise en évidence dans le liquide céphalorachidien (34).

Lactosidérophiline (lactotransferrine)

Une lactosidérophiline a été isolée en 1960 par MONTREUIL et MULLET (110) du lait de femme. Il s'agit d'un mucoïde (gynolactomucoïde 11) qui diffère de la sidérophiline par une capacité de fixation du fer plus élevée (3,5 ug de fer par mg de protéine au lieu de 1,25 ug dans la sidérophiline).

La même année deux publications, celle de JOHANSSON (81) et celle de GROVES (65) rapportent l'analyse d'une protéine rouge isolée du lait humain bovin. Sa teneur en fer (1 à 1,2 %) est plus faible que dans la sidérophiline (1,25) et dans la conalbumine (1,59). Cette protéine rouge et la lactosidérophiline semblent n'être que la même protéine obtenue à des états de pureté différents.

La lactosidérophiline présente beaucoup d'analogies avec la sidérophiline plasmatique et la conalbumine, mais la liaison y serait peut être différente car le complexe est plus stable. Il n'y a d'autre part aucune parenté immunochimique entre les deux protéines porteuses de fer du plasma et du lait (20).

FERRITINE et HEMOSIDERINE

Ferritine

La ferritine est constituée par une protéine, l'apoferritine, associée à du fer. Elle se trouve dans les tissus et on a signalé sa présence dans le sérum au cours de certaines affections (163).

L'apoferritine a un poids moléculaire de 465 000, elle est donc plus voisine des globulines que de l'albumine (7). Sa composition en acides aminés est connue (61) (162).

Le fer de la ferritine est magnétiquement différent du fer de tous les autres composés biologiques, il est le seul à posséder une susceptibilité magnétique équivalente à 3 électrons impairs par atome de fer (61).

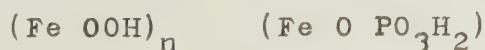
Ce fer se trouve à l'état d'hydroxyde de fer où certains groupes OH sont remplacés par des restes phosphorylés PO_3H_2 .

La formule admise depuis longtemps est :



où il y a un rapport P/Fe = 1/9

Elle ne serait pas tout à fait inexacte, et il vaudrait mieux écrire (98) :



(n'étant compris entre 5 et 14).

Cet hydroxyphosphate prend la forme de micelles de 55 Å de diamètre dont on ignore la constitution exacte (60). Il représente jusqu'à 40 % du poids sec de la protéine (soit 25 % en fer). Au microscope électronique les granules ferrugineux sont formés de 4 petits amas très foncés entourés d'une atmosphère plus claire (11).

Le fer incorporé dans l'apoferritine est dissimulé à ses réactifs, mais il peut être enlevé par des agents réducteurs, comme l'hydrosulfite, la cystéine, sans qu'il y ait dénaturation de la protéine, comme le prouve l'identité morphologique des cristaux de ferritine et d'apoferritine. De l'eau prend dans l'apoferritine la place laissée vacante par la perte du fer (63) (99).

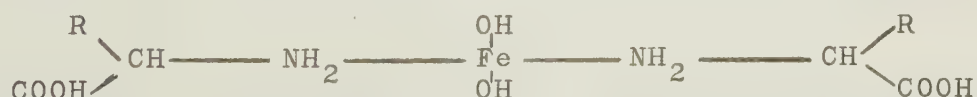
L'absence de fer rend l'apoferritine plus stable que la ferritine; en solutions concentrées la ferritine coagule à 65-70° tandis que l'apoferritine ne coagule pas (60).

La position de ces micelles ferriques dans l'agrégat micellaire protéique a fait l'objet d'hypothèses dont les arguments sont insuffisants pour entraîner une certitude. Pour les uns elles sont à la surface de la molécule (puisque le fer peut être enlevé sans dénaturer la protéine), pour d'autres elles seraient en profondeur, entre les micelles protéiques; d'ailleurs l'espace qui sépare les micelles de fer est identique à l'espace séparant les micelles protéiques, ce qui implique une situation intercalaire des uns et des autres. La microscopie électronique confirme la dispersion des micelles de fer dans les mailles du réseau protéique (52), où elles serviraient de lien interparticulaire.

Si le fer est à l'intérieur de la molécule on imagine mal comment le fer peut passer à travers le réseau protéique. HARRISON (70) propose un assemblage de micelle protéiques en un polyèdre semi-régulier dont certaines faces présenteraient de larges passages rendant possible le cheminement du fer.

Des considérations physiologiques font supposer à certains qu'il y a du fer à la fois en surface et dans l'intérieur; entre ces deux positions existe un équilibre, donc des échanges (52). La réduction des ions ferriques de la surface, par la cystéine par exemple, entraînerait un appel des ions ferriques de la profondeur tandis que le fer devenu ferreux quitte la molécule protéique.

On s'est demandé aussi comment les micelles de fer étaient liées aux micelles protéiques. GRANICK (61) pense que chaque micelle ferrique tient au moins par une liaison à la micelle protéique. On a suggéré que cette liaison est analogue à celle que contracte le fer avec les acides aminés (6).

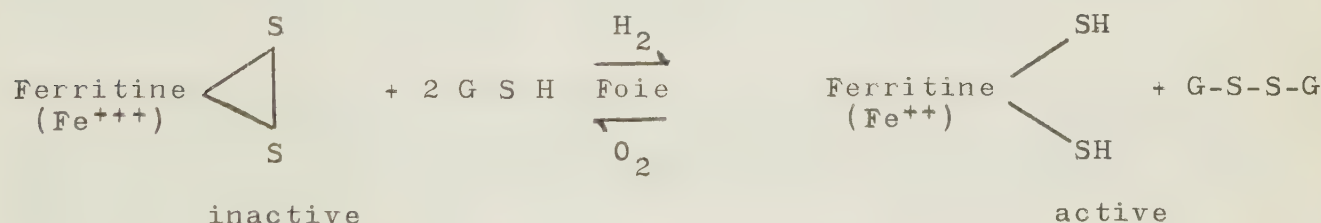


Mais d'après MAGNAN de BORNIER (98) s'il y a une liaison, elle ne doit être ni purement chimique ni résulter d'un simple mécanisme d'adsorption. De son côté HARRISON (70) entrevoit des lieux spécifiques de fixation du fer. En tous cas, dans la séparation des acides aminés de la ferritine par chromatographie, le fer migre avec la fraction contenant la valine, la phénylalanine et la méthionine (162).

La question se complique du fait que la molécule de ferritine n'est pas homogène (7). La ferritine isolée de la rate de cheval est constituée par deux fractions : 1^{re} une facilement coagulable saturée en fer, où le rapport N/Fe = 2,5 et une seconde fraction de composition variable où le rapport N/Fe varie de 0 à 2,5 (117)

Enfin, il faudrait peut être envisager un état différent des micelles ferriques suivant qu'elles se trouvent à la surface ou dans la profondeur de la molécule protéique. A l'intérieur elles seraient dispersées sans liaison (7), à l'extérieur interviendrait les groupements sulfhydriles, qui, effectivement, sont localisés à la surface de la molécule. Le fer chélaté y serait à l'état ferreux dans la proportion de 0,25 à 1 % du fer de la ferritine (98). Lorsque ces groupements sont oxydés ou bloqués le fer reprend l'état trivalent (70) (106)

Plusieurs expériences confirment cette transformation du sel ferreux en sel ferrique et reciproquement (95) (105) (107)



On a attribué aux groupements sulfhydriles et au sel ferreux les propriétés vasodépressives et antidiurétiques de la ferritine (47) (106)

Hémosidérine

L'hémosidérine apparaît en quantité notable dans les cas d'hypersidérose. Sa constitution est mal connue.

Son fer contrairement à celui de la ferritine est révéla-ble par réaction au ferricyanure ou au ferrocyanure. L'analyse d'une hémosidérine amorphe isolée de rate de cheval a permis de préciser sa constitution.

Elle contient 18 acides aminés comme l'apoferritine, de la guanine, du désoxyribose, de l'acide phosphorique. Le composé ferrugineux représente environ 59 % de l'hémosidérine soit 35 % de fer c'est un polymère de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ sous forme de gel amorphe (162).

Il a été suggéré que l'hémosidérine soit une forme de ferritine qui a subi un réarrangement moléculaire permettant une adsorption plus importante de fer. Cependant l'analyse de granules d'hémosidérine révèle des différences avec la ferritine, en particulier l'affinité du composant protéique de l'hémosidérine pour le fer n'est que le dixième de celle de l'apoferritine, lorsqu'on fait ces mesures dans l'acide mercaptoacétique (139).

Il faut aussi noter que l'hémosidérine apparaît très hétérogène (139). La composition est beaucoup plus variable que celle de la ferritine (71) (126). Le fer y contracterait des liaisons différentes, ce qui explique qu'une partie seulement du fer soit aisément extractible par EDTA (97).

L'hémosidérine serait une forme de fer peu mobilisable. D'ailleurs suivant SCHWIETZER (138) l'hémosidérine vieillirait dès son apparition dans les tissus, elle passerait à la phase amorphe à la phase cristalline (identique à la limonite) et sous cette forme minérale, elle n'est plus utilisable.

Le fer se trouve donc dans l'organisme soit sous forme de composés chélatés stables comme l'hémoglobine, la sidérophiline, soit sous forme de composés moins stables où il est lié faiblement ou peut être même simplement adsorbé sur une protéine.

Son métabolisme met en jeu des facteurs de réduction et des facteurs d'oxydation assurant le passage nécessaire de l'état ferreux à l'état ferrique (et inversement) et d'autre part, il fait entrer en concurrence des forces de liaison, des affinités protéiques dissemblables.

Puisque le fer peut se trouver dans des états aussi différents et avec des liaisons souvent non spécifiques dans les milieux biologiques, il nous a paru intéressant d'étudier in vitro la fixation du fer sur les éléments protéiques, de la comparer à celle d'autres ions métalliques et de tenter d'établir à partir de ces expériences des échelles d'affinité des ions métalliques pour divers substrats.

Nous avons, dans la première Partie de notre Travail, étudié le comportement du fer vis-à-vis d'une cellule bien individualisée, l'hématie, et nous avons décrit à ce propos nos méthodes expérimentales et les raisons qui nous ont fait choisir le sulfate ferrique ammoniacal pour nos recherches. Nous avons comparé les effets du fer et d'autres métaux.

Dans une seconde Partie, nous avons d'abord signalé quelques essais sur des tissus in vitro et sur l'intestin isolé. Puis, nous avons étudié l'action précipitante des métaux, du fer en particulier, sur des protéines. Nous avons essayé de donner une interprétation aux résultats obtenus.

La relativité des forces de liaison des éléments métalliques avec les protéines jouant un rôle très important dans les échanges possibles de l'organisme, nous nous sommes arrêté sur le dosage de la sidérophiline basé justement sur la force de fixation du fer dans le plasma.

Enfin, nous avons terminé notre Travail par la mesure d'une activité biochimique mettant en jeu l'intervention de sels métalliques sur une protéines, l'inhibition de la catalase.

1ère Partie

COMPORTEMENT DU FER VIS-A-VIS DE L'HEMATIE

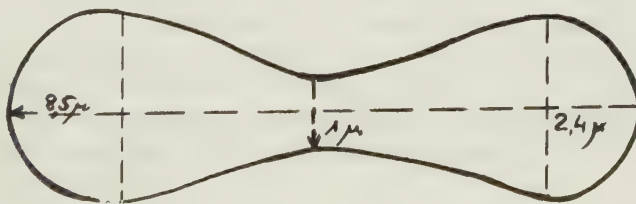
A - L'HEMATIE

L'hématie se prête particulièrement bien à l'observation des phénomènes de sorption. Comme l'écrit CAZAL (30) : "La surface des érythrocytes possède des propriétés particulières qui la distinguent nettement des membranes inertes elle peut attirer et retenir par un processus physico-chimique de nombreuses substances primitivement étrangères en globule, qui constituent un véritable revêtement". La substance est "accrétée".

L'hématie est évidemment une cellule d'un type particulier. Cependant WILBRANDT (161) l'a beaucoup utilisée dans des expériences sur la perméabilité des membranes cellulaires, "l'érythrocyte dit-il, est semblable à un homme âgé qui a connu de beaux jours et garde un certain nombre de souvenirs de ce vieux temps. Quelques-uns de ces souvenirs peuvent être vagues et, s'ils s'expriment, c'est de façon certainement moins dramatique que lorsqu'ils atteignent les cellules vivantes. Cependant si on pose au globule rouge des questions qu'il peut comprendre, il donne dans un certain nombre de cas, des réponses intéressantes".

1 - Biométrie de l'érythrocyte vivant

PONDER (119) (30) s'est attaché à préciser exactement la taille et la forme d'un érythrocyte vivant. Pour cela, il observa des érythrocytes en suspension dans leur propre plasma et prit des photographies instantanées au moment où, tournant sur eux-mêmes, ils se présentaient exactement de profil. Au moyen d'un grand nombre de photographies ainsi prises à un grossissement connu, il put construire un modèle en prenant la moyenne des distances entre 12 points fixes du pourtour globulaire.



Modèle érythrocytaire de PONDER

Dans le modèle moyen ainsi obtenu, le diamètre mesure $8,5 \mu$, l'épaisseur maximale $2,4 \mu$, l'épaisseur minimale 1μ ; la distance séparant la partie la plus large du bord du globule est $1,3 \mu$. Le calcul exact du volume et de la surface d'une telle hématie a pu être fait en considérant l'hématie comme un solide de révolution autour de son axe central et en appliquant les théorèmes de

Guldin. Le volume moyen ainsi trouvé est de $94 \mu^3$ et la surface moyenne $163 \mu^2$.

HOUCHIN, MUNN, PARNELL (75) donnent des chiffres légèrement différents : diamètre $8,28 \mu$, épaisseur $1,71 \mu$, volume $82 \mu^3$, surface $134 \mu^2$.

Dans chacun de nos essais, la surface des hématies est considérable : en effet, nous utilisons en général 3 ml d'une suspension au tiers d'hématies (*), soit 3,5 millions d'érythrocytes par mm^3 , ce qui correspondant à une surface totale de $1,71 \text{ m}^2$.

Cette grande surface constitue un des avantages du substrat hématique pour mettre en évidence l'affinité d'un élément pour la matière vivante.

2 - Structure

Il est classique de définir et d'étudier dans l'érythrocyte deux parties distinctes après hémolyse ; l'une soluble (solution d'hémoglobine à 30 %) l'autre insoluble : le stroma. Cette distinction est bien artificielle : il est impossible de priver d'hémoglobine par lavages les stromas obtenus après hémolyse quelle que soit la méthode utilisée (3), au point que certains (149) pensent qu'il s'agit d'un constituant propre au stroma. En fait la solution hypotonique dénature une partie des protéines et les insolubilise (120). Le stroma apparaît donc comme un artefact de coagulation.

Le stroma est plus volontiers représenté actuellement comme une membrane avec quelques tractus à l'intérieur du globule. La couche profonde de même que les tractus internes de cette membrane sont mal limités en ce sens qu'ils sont en relation étroite avec le contenu hémoglobinique (119). Il y a très probablement dans la couche profonde comme le dit CAZAL (30), "Une concentration décroissante en constituants stromatiques orientés et une concentration croissante en hémoglobine à mesure que l'on passe de la surface à la profondeur".

La microscopie électronique avait fait naître beaucoup d'espoir dans la connaissance de la structure de l'érythrocyte, mais les résultats obtenus ne sont pas convaincants, le procédé ayant été le plus souvent appliqué à l'étude du stroma lui-même.

(*) il s'agit d'hématies conservées sur mélange ACD (citrate de sodium 1,33 g - Acide citrique 0,47 g - Glucose 3 g pour 100 ml).

Or, comme nous venons de le dire, ce dernier est préparé par hémolyse de l'hématie et lavages répétés avec des solutions sans électrolytes qui provoquent une perte de matériel et aussi une dénaturation des protéines. De plus, les différents auteurs qui ont utilisé la microscopie électronique ne sont que rarement d'accord car les résultats sont peu reproductibles (120)

Si on laisse de côté les détails, on doit reconnaître que toutes les descriptions des couches superficielles lipoprotéiques du stroma sont bâties sur un même schéma celui de PONDER : les molécules lipidiques sont orientées perpendiculairement à la surface, les protéines sont orientées tangentielle-ment. La rigidité du schéma correspond à un artefact de coagulation dû à l'hémolyse nécessaire à l'obtention du stroma (9).

Un aspect plus vivant de l'hématie apparaît dans les observations en contraste de phase qui ont révélé dans certaines conditions, un phénomène de scintillation appelé "flicker". Ce flicker a été comparé au vent soufflant sur un champ de blé. Il disparaît dès que les hématies deviennent sphériques et il est apparemment lié au métabolisme. Il indiquerait que les molécules de la surface ne sont pas toutes dans le même état au même moment (21).

D'autres travaux faits avec des colorants alcalins et acides (148) donnent à la membrane de l'érythrocyte cette même structure mobile, non définie, liquide, capable de former une sphère de myeline contenant des lipides fluides ou semi-fluides. Cette membrane est in vivo en état d'équilibre dynamique avec les lipides du plasma : les molécules lipidiques et protéiques quittent constamment la surface de l'hématie et leur place est prise par des molécules semblables provenant du plasma. Nous signalerons d'ailleurs dans la constitution protéique de l'hématie des analogies avec la composition protéique plasmatique.

3 - Constituants protéiques

Les globules rouges dont 1000 ml pèsent 1097 g contiennent :

- 65 p. 100 d'eau soit 707 g
- 35 p. 100 de résidu sec soit 390 g

Dans ces 390 g. 360 reviennent à l'hémoglobine. Cette énorme quantité fait oublier que l'hématie contient d'autres éléments de nature protéique. Il s'agit en particulier de lipoprotéines. Le principal constituant est la stromine ou réticuline dont la fraction protéique constitue la stromatine (30). Cette stromatine a été indiquée sous le nom d'élinine lorsqu'elle n'est pas débarrassée complètement des lipides (46).

On a mis aussi en évidence d'autres protéines : une protéine soufrée (S protéine), une globuline, une albumine (30) et diverses lipoprotéines ; l'hématie ne contiendrait pas de lipides libres (46) (125).

Des analyses électrophorétiques sur gel d'amidon (55) ont permis d'identifier dans les hémolysats une albumine identique à la sérum albumine, ce qui est en faveur d'une liaison de l'hémoglobine ou de ses dérivés avec l'albumine, d'autant plus que PONDER (120) indique la présence d'une protéine sérique située à l'intérieur de l'hématie.

De leur côté ROSE et coll. (130) caractérisant aussi dans un hémolysat, au moyen de l'immunoélectrophorèse, l'albumine, les globulines alpha 1, alpha 2, bêta 2;

Mandel et CHAMBON (102) ont montré en 1959, par chromatographie sur résines échangeuses d'ions, que les érythrocytes humains contiennent des nucléosides, mono di et triphosphates, de l'adénine, de la guanine, de la cytosine, de l'uracile, du DPN et du TPN.

La chromatographie sur papier a révélé dans les hématies une composition en acides aminés libres à peu près identique à celle du plasma (104). Ces acides aminés sont distribués à peu près uniformément dans toute l'hématie. Au contraire, les lipides prédominent à la surface (37), mais ne forment sûrement pas une membrane continue encerclant les protéines (53)

4 - Fer non hémoglobinique

Des hématies appelées sidérocytes contiennent des granulations colorables par la réaction du bleu de Prusse au ferrocyanure de potassium. Ces hématies se rencontrent fréquemment après splénectomie, dans le saturnisme, dans certaines affections hémolytiques, dans la maladie de Cooley et dans diverses érythropathies, caractérisées par un défaut qualificatif dans la synthèse de l'hémoglobine. CAZAL écrit (30) : "il s'agit là de fer trivalent "démasqué" puisqu'il donne la réaction au bleu de Prusse, mais diffèrent de l'hémosidérine. Il est probable que ces granulations sont constituées par du fer destiné à être incorporé dans les cycles porphyriques et venant d'être libéré de la transferrine plasmatique".

Beaucoup plus récemment, BESSIS et BRETON - GORIUS (13) grace au microscope électronique ont pu photographier des molécules de ferritine dans des hématies. Il existe donc bien dans l'érythrocyte du fer "visible" différent du fer de l'hémoglobine. Cependant son existence a été contestée par des chimistes.

LAURELL (92) considérait ce fer comme inexistant parce que sa définition est basée sur sa solubilité dans les acides ; or une petite partie du fer hémoglobinique pourrait passer en solution dans HCl 0,1 N (41) (42).

Plus récemment DREYFUS et SCHAPIRA (47) faisant état d'expériences où on voit diminuer le fer non hémoglobinique en fonction du taux d'hémoglobine, sans qu'il y ait jamais dissociation écrivent "Le fer labile est sans doute un artefact... l'intérêt clinique de son dosage paraît actuellement nul".

Cependant plusieurs auteurs n'utilisent pas l'acidosolubilité comme test de la présence d'un fer labile arrivent à des résultats différents. KLUMPP (88) mesure la capacité de fixation d'oxygène de globules rouges, en déduit le taux d'hémoglobine et trouve une différence variable entre ce taux et le chiffre de fer total. JENKINS et THOMSON (80) déterminent l'hémoglobine par saturation à l'oxyde de carbone et décèlent aussi un fer non hémoglobinique, dont le taux augmente quant celui d'hémoglobine diminue.

Enfin, BERNARD et COLL. (8) négligeant le fer sérique dosent d'une part le fer total du sang après minéralisation sulfoperochlorique et d'autre part l'hémoglobine sous forme de cyanméthémoglobine. Ils déduisent que 100 ml de sang contiennent normalement 49,6 mg de fer total, 47,8 mg de fer hémoglobinique, donc : 1,8 mg de fer non hémoglobinique, soit 3,6 p. 100 du fer total, ces chiffres sont modifiés dans des cas pathologiques.

Ayant eu l'occasion d'analyser le sang d'un malade atteint d'hémochromatose, nous nous sommes intéressé au dosage du fer labile dit non hémoglobinique des hématies. Nous avons dosé en fait le fer acidosoluble.

Nous avons débarrassé les hématies du plasma par lavages à l'eau salée à 8,5 g p. 1000. Mises en suspension dans le double de leur volume d'eau salée, ces hématies sont hémolysées par dilution avec de l'eau distillée (1 ml d'hématies + 2 ml de soluté de Cl Na + 7 ml d'eau distillée). Nous nous sommes assuré que l'hémolyse était totale.

Le dosage est pratiqué suivant la technique indiquée plus loin après addition d'acide chlorhydrique et d'acide trichloracétique. Nous avons vérifié que les stromas séparés du liquide d'hémolyse ne cèdent pas de fer dosable par un traitement identique.

Nous trouvons chez des sujets sains des taux de fer acidosoluble variant de 600 à 1000 μ g p. 1000 ml d'hématies. Il ne semblait pas y avoir proportionnalité avec la quantité d'hémoglobine. Nous avons en effet obtenu par exemple sur 3 échantillons de sang où le dosage colorimétrique de l'hémoglobine donnait des teneurs de 130 g, 124 g, 122 g par litre de sang; les chiffres suivants de fer acidosoluble 575, 650, 750 μ g p. 100 ml d'hématies.

Nous avons pensé que la nature de l'anticoagulant pouvait jouer. Nous avons donc fait un dosage de fer libérable par HCl sur

un sang recueilli d'une part sur héparine, d'autre part sur le mélange ACD employé en transfusion sanguine (page 3).

Les résultats sont pratiquement identiques : 1000 μg pour le sang recueilli sur héparine et 975 μg pour le sang recueilli sur ACD p. 100 ml d'hématies.

Chez un malade atteint d'hémochromatose, traité par des saignées massives et répétées, nous avons trouvé successivement

- 1000 μg de fer "non hémoglobinique"				
- 750	-	-	-	13 jours plus tard
- 575	-	-	-	20 - - -

Nous pensons que le fer acido-soluble, sans représenter peut être uniquement le fer non hémoglobinique, pourrait néanmoins avoir une signification étant donnés les résultats de BERNARD et coll. signalés plus haut.

B - PHOTOCOLE DES ESSAIS DE FIXATION METALLIQUE SUR LES HEMATIES

Dans nos expériences, nous avons adopté la technique préconisée par S. BESSON et O GEYER et largement utilisée par J. TAVERNIER. (17) (147)

Le substrat est constitué par des hématies humaines recueillies au Centre de Transfusion de Nancy sur le mélange anticoagulant A.C.D. (page 3)

Les globules rouges sont séparés par centrifugation du plasma, ils sont ensuite remis en suspension dans deux fois leur volume d'une solution isotonique de chlorure de sodium à 9 g. p. 1000 ou de nitrate de sodium à 13,60 g p. 1000, puis à nouveau centrifugés. Ce lavage est répété trois fois pour éliminer complètement les protéines plasmatiques et le citrate du milieu anticoagulant. On réalise ensuite une suspension au tiers des hématies dans le soluté isotonique qu'on vérifie par l'hématocrite. Le nombre d'hématies par mm^3 de cette suspension est voisine de 3,5 millions. (127)

Sauf indication contraire, nos essais de fixation ou d'agglutination sont faits sur une quantité fixe de globules rouges 1 ml (soit 3 ml de suspension à 1/3) dispersés dans 20 ml de solution isotonique contenant le cation étudié.

C - DOSAGE DU FER

Les méthodes de dosage colorimétriques du fer sont très nombreuses. Les listes qui ont paru dans des ouvrages ou des revues sont d'autant plus complètes que récentes, car de nouvelles techniques sont sans cesse proposées. Ces nouvelles techniques répondent à deux buts : d'une part, utiliser un réactif aussi sélectif que possible mais néanmoins sensible et d'autre part, permettre d'effectuer le dosage du cuivre et du fer sur un même échantillon. C'est ainsi qu'on a préconisé la terpyridine et le dosage peut s'effectuer directement sur le sérum en présence des protéines. (150)

A l'époque où nous avons commencé nos expériences, un examen attentif des méthodes utilisables nous a fait choisir la méthode à l'o-phénanthroline qui était la plus utilisée dans les analyses biologiques.

Comme nous devions pratiquer dans certaines expériences à la fois le dosage du fer et du cuivre, nous avons été tenté par la bathophénantroline (pour Fe) et la cupréine (pour Cu) ; mais nous ne reçûmes la bathophénantroline qu'après avoir traité nos expériences. Soulignons d'ailleurs que la terpyridine et la bathophénantroline sont des réactifs coûteux et qu'en fin de compte à côté d'avantages certains, ils possèdent des inconvénients (150) (165)

Il nous paraît donc que la méthode à l'o-phénanthroline conserve toute sa valeur.

Méthode à l'o-phénanthroline

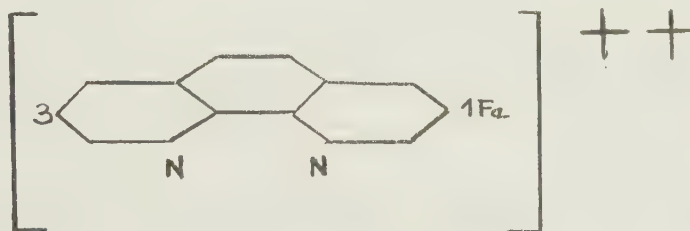
Nous avons utilisé la technique mise au point en 1937 par HEILMEYER et PLOETNER pour le dosage du fer sérique. HEMMLER (72) en a donné une étude détaillée.

Après avoir rappelé son principe, nous décrirons cette technique telle que l'ont proposée SCHAPIRA et coll. (137) et que l'a utilisée DAUBINET (140) et nous reprendrons en détail les différentes manipulations en insistant sur les précautions indispensables.

Principe

Le fer du sérum lié à la sidérophiline, ou le fer d'une solution contenant des protéines est libéré par l'acide chlorhydrique. Puis les protéines, en particulier l'hémoglobine, sont précipitées par l'acide trichloracétique.

On provoque à pH 4,6 la formation d'un complexe rouge-saumon avec l'o-phénanthroline après avoir transformé les ions ferriques en ions ferreux à l'aide d'un réducteur. Dans le complexe, une molécule de fer est liée à 3 molécules d'o-phénanthroline.



Parmi les agents réducteurs utilisés, SCHAPIRA et coll. ont choisi le sulfate d'hydrazine préconisé par HOYER (76).

Mode opératoire

Matériel

Toute la verrerie est soigneusement lavée, plongée pendant 24 h dans HCL à 10 p. 100, lavée à l'eau chaude puis à l'eau distillée. Nous avons utilisé de la verrerie Pyrex dans la mesure du possible.

Réactifs

Les produits chimiques utilisés, Merck ou Prolabo, sont exempts de fer. L'eau qui a servi aux dilutions et à la préparation des réactifs a été obtenue pour distillation dans un appareil en verre rodé Pyrex.

- 1 - acide chlorhydrique 6 N obtenu par dilution 1/2 de ClH fumant
- 2 - acide chlorhydrique approximativement N obtenu par dilution 1/6 de ClH 6 N
- 3 - acide trichloracétique à 20 %
- 4 - paranitrophénol à 1 % dans l'alcool à 95°
- 5 - ammoniacque pure à 20 %
- 6 - solution de sulfate d'hydrazine à 1 % Dans le tampon à pH 4,6
- 7 - tampon 2 M à pH 4,6 : 76 g acélate de soude, 40 g acide acétique, H₂O q.s.p. 600 ml
- 8 - Orthophénanthroline à 0,2 % dans l'eau acidifiée par IV gouttes de HCl 6 N pour 100 ml (la dissolution est lente; nous préparons cette solution 24 heures avant l'emploi.

Technique proprement dite

Dans un tube à centrifuger de 10 ml mettre successivement :

2 ml de sérum ou de solution contenant du fer,
1 ml HCL 6 N. Agiter, laisser en contact 30 minutes
Ajouter 2 ml CCl_3COOH 20 %. Agiter, laisser en contact 15 minutes, centrifuger.

Dans un tube à essai jaugé à 5 ml on prélève 2 ml du liquide surnageant clair. On ajoute II gouttes de solution de p-nitrophénol, puis goutte à goutte de l'ammoniaque à 20 % jusqu'à coloration jaune. Ensuite goutte à goutte HCl N jusqu'à décoloration ; 0,5 ml de sulfate d'hydrazine à 1 % dans le tampon et, après 10 minutes, 0,25 ml d'o-phénanthroline à 0,2 %. Enfin on complète à 5 ml avec de l'eau. La lecture s'effectue au spectrophotomètre à 510 mμ après 24 heures.

Etude de la méthode

Nous insisterons sur quelques points.

Libération du fer

La méthode qui vient en premier lieu à l'esprit est la calcination sèche ou humide. Mais la calcination libère totalement le fer quelle que soit sa provenance, fer sérique ou fer hémoglobinique.

Dans nos essais et lors dosage du fer sérique, il importe de ne pas libérer le fer de l'hémoglobine mais bien au contraire de l'éliminer. C'est ce que réalise l'acide trichloracétique à 20 %

L'acide chlorhydrique utilisé pour la libération du fer à un titre 6 N. A cette concentration, il détache le fer fixé sur la sidérophiline. Un acide concentré coagulerait brutalement les protéines qui retiendraient du fer, un acide plus faible ne détacherait pas la totalité du fer de son complexe.

DEJARDIN et LAMBRECHT (42) proposaient de remplacer HCl 6 N par le citrate de Na, réactif moins brutal. Les résultats obtenus sont les mêmes par les deux procédés. Mais il semble bien que l'habitude d'utiliser HCl ait prévalu, car nous n'avons pas trouvé de techniques mettant en oeuvre le citrate de Na en dehors de celle des auteurs cités. Le pyrophosphate, par contre, est indiqué comme ne libérant pas totalement le fer alors que dans les travaux antérieurs le pyrophosphate était couramment employé (47).

La centrifugation du précipité protéique, même à cette grande vitesse, laisse souvent persister une fine suspension dans le liquide surnageant. D'où l'indication de filtrer sur des filtres spéciaux sans fer type Schleicher et Schüll n° 5892, le fer ne se fixant pas sur le papier filtre en milieu acide, personnellement nous avons toujours obtenu des liquides clairs.

Réalisation du pH optimum pour la coloration

La formation du complexe coloré n'est complète et relativement rapide qu'à un pH de 4,6. L'addition successive d'ammoniaque et d'acide chlorhydrique en présence de p-nitrophénol comme indicateur est un moyen commode d'ajuster ce pH qui est stabilisé par l'addition de la solution tampon acide acétique-acétate (qui contient l'hydrazine).

Réduction du fer

L'o-phénanthroline ne forme un complexe coloré qu'avec Fe^{++} . Parmi les réducteurs utilisés (hydrosulfite de Na, hydroquinone, hydrogène naissant), le sulfate d'hydrazine paraît le plus efficace (76).

Influence de la température

L'abaissement de la température ralentit la cinétique de la réaction Fe^{++} -o-phénanthroline. Nous avons toujours opéré à la température du laboratoire et nous avons attendu 24 heures avant de faire les lectures ce qui met à l'abri de toute erreur due à un développement ralenti de la coloration.

Stabilité de la coloration

La coloration est connue comme étant très stable, nous avons d'ailleurs vérifié qu'elle persistait pendant des mois, ce qui présente un intérêt considérable.

Etalonnage du spectrophotomètre

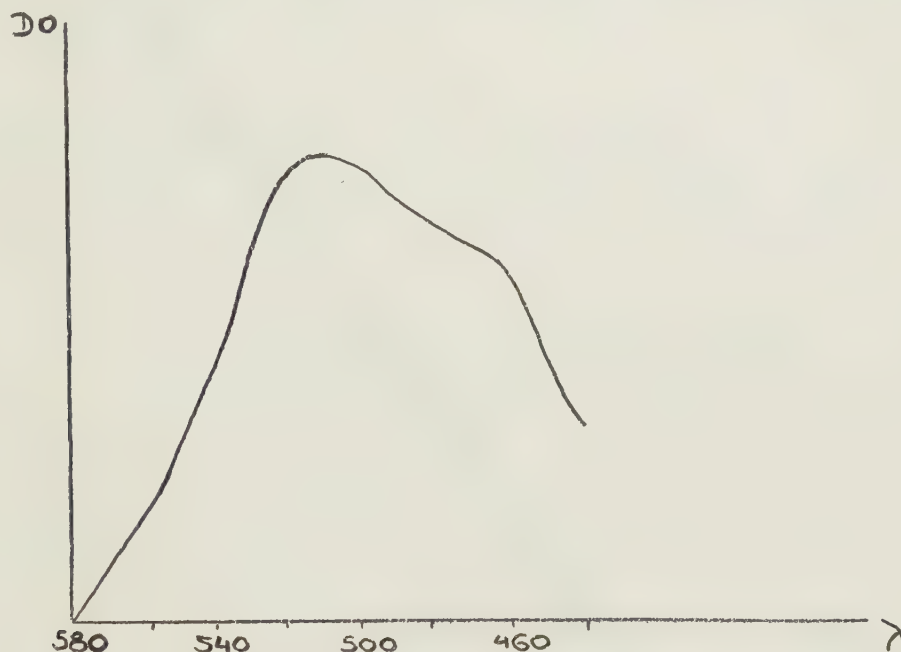
Nous avons utilisé le spectrophotomètre de BONET-MAURY. Une solution mère de sel de fer est obtenue à partir de 100 mg de fer en fil de clavecin dégraissé à l'éther, pesés très exactement et dissous au bain-marie dans 150 ml HCl concentré + 10 ml H₂O. On complète à 1000 ml.

Nous avons dilué cette solution mère pour obtenir une gamme contenant 25, 50, 75, 100.....1000 ug dans 100 ml. Nous avons traité cette gamme suivant la technique indiquée ci-dessus.

Nous avons obtenu le graphique page 13

La loi de Beer-Lambert est bien respectée, il y a une relation linéaire entre les densités optiques et les quantités de fer. (*)

La courbe d'absorption du complexe avec l'o-phénanthroline en fonction de la longueur d'onde est la suivante :



Nous avons donc, comme tous les auteurs le conseillent, effectué nos lectures à 510 mμ

(*) A ce propos, nous signalons la remarque très judicieuse de GUILLOT (67).

" La réaction suit la loi de Beer-Lambert, n'a pour le physicien aucun sens. Dans la réalité, si les chimistes prennent la précaution de donner ce renseignement, c'est parce qu'en fait, le plus souvent, on n'utilise pas une radiation monochromatique, mais simplement une bande spectrale considérée comme assez étroite pour être assimilable à une radiation monochromatique. Or, cette assimilation n'est jamais licite, quel que soit le dispositif de sélection de la bande utilisé. Suivant les cas, le domaine d'application approximative de la loi linéaire pourra alors s'étendre d'une densité optique de zéro à une de 0,5 ou encore de zéro à 1, mais il arrivera toujours un moment où la courbe expérimentale s'écartera nettement de la droite, à cause de la non homogénéité de la lumière utilisée".

DOSAGE DU FER PAR LA METHODE A L'O-PHENANTHROLINE

Spectrophotocolorimètre BONET-MAURY

= 510 mμ

cuve de 1 cm

en centièmes

75

50

25

0

5

10

15

20

25

30

ug de Fer dans 1 ml de solution (P.E)

Sensibilité de la méthode

Il est possible de détecter par cette méthode jusqu'à 5 à 10 μg de fer dans 100 ml. Etant donné qu'on a proposé de substituer à l'o-phénanthroline d'autres réactifs du fer, il est intéressant de signaler que le coefficient d'extinction du complexe Fer-o-phénanthroline a une valeur égale à la moitié de celui obtenu avec la terpyridine, mais une valeur supérieure de un tiers à celui du complexe obtenu avec l'alpha-alpha-1 dipyridile.

Ions gênants

Dans nos expériences, seul le cuivre pouvait intervenir mais cette interférence n'apparaît qu'avec 1000 mg de cuivre pour 100 ml, concentration dépassant largement les doses que nous utilisons ; nous n'avons donc pas eu à en tenir compte dans nos dosages.

D - RECHERCHE DES DIVERS SELS DE FER POSSEDANT UNE ACTION SUR LES HEMATIES

Nos essais préliminaires ont porté sur la recherche d'un sel de fer permettant une liaison de ce métal avec les hématies. Pour matérialiser cette liaison, nous avons étudié d'une part l'agglutination et, d'autre part, la fixation quantitative. Voici nos essais avec plusieurs sels de fer.

1 - Le sulfate ferreux ammoniacal (sel de Mohr) $\text{SO}_4\text{Fe SO}_4(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Une solution relativement concentrée de sel de Mohr (M/50) ne montre aucun effet agglutinant sur les hématies, même à dose élevée soit 18 ml pour 3 ml d'hématies en suspension au tiers. D'ailleurs cette solution présente rapidement un trouble.

Des essais sont repris avec une solution deux fois plus concentrée (M/25). Cette solution est de stabilité plus grande, elle reste limpide plusieurs jours. Une agglutination apparaît immédiatement pour 1 ml de cette dernière solution, lorsque nous diminuons la quantité de fer l'agglutination apparaît tardivement.

Ce temps de latence nous fait penser que l'agglutination est due au sel ferrique formé par oxydation lente dans le milieu.

Pour vérifier que l'activité agglutinante observée n'est pas due au sel ferreux, nous avons répété l'essai avec la solution stabilisée par de l'acide ascorbique. Tandis que 1 ml de solution témoin entraînait l'agglutination des hématies en quelques minutes 1 ml de solution stabilisée ne laissait apparaître aucune agglutination même après 2 heures.

Pour nous rendre compte de l'évolution de la solution de sel ferreux au contact des hématies, nous avons ajouté à des quantités variables de solution de sel de Mohr à 7 g p. 1000 (1mg Fe/ml) 1 ml d'hématies (sous forme de suspension à 1/3). Le volume total de chaque essai est amené à 20 ml et l'expérience est effectuée aux températures de + 4° et + 20°. Voici les résultats obtenus après 24 heures :

Fe⁺⁺ disparu de la solution de sel de Mohr au contact de 1 ml d'hématies en fonction de la quantité de fer apportée et de la température (contact 24 h.)

Température = + 20°

Fer apporté en µg.	5000	4000	3000	2000	1000	500	200
Fer disparu "	320	760	400	560	260	70	42

Température = + 4°

Expérience I

Fer apporté en µg	5000	4240	4000	3400	2720	2540	1880	1480	980	200
Fer disparu en µg.	100	140	320	400	320	300	140	152	196	20

Expérience II

Fer apporté en µg.	2880	984	480
Fer disparu "	240	208	16

La disparité des chiffres est évidente. Comme le sel ferreux n'était pas stabilisé, il est probable que le fer s'est fixé sous une forme oxydée, étant donné l'instabilité de la solution de sel de Mohr qui se trouble assez rapidement ; il est aussi très vraisemblable que de l'hydroxyde s'est formé et a été entraîné avec les globules au cours de la centrifugation. Les résultats obtenus ne sont donc pas interprétables et le sel de Mohr est inutilisable, pour une étude de combinaison avec un substrat biologique.

2 - Le citrate de fer ammoniacal

Nous verrons que le citrate de fer a été employé dans des essais de fixation du fer mais le citrate est un anion qui s'oppose à la pénétration des cations (31). Nous avons néanmoins examiné l'effet éventuel du citrate de fer sur les hématies.

Avec des quantités allant de 200 à 5000 μg . même après une nuit de contact à la glacière, il ne se produit aucune agglutination.

Vraisemblablement, il n'y avait pas de fixation sur les hématies. C'est ce que nous avons effectivement constaté après avoir mis en contact ces mêmes quantités de citrate et 1 ml de globules rouges.

Ce sel ne convient donc pas pour nos essais.

3 - Le chlorure ferrique

Ce sel est difficilement obtenu à l'état pur et il est très hygroscopique. Nous avons renoncé à l'employer.

4 - Le sulfate ferrique ammoniacal (alun de fer) $\text{Fe}_2 (\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4, 24 \text{ H}_2\text{O}$ (P.M. = 964,43).

Il existe commercialement à l'état pur dans la qualité "pour analyses" et semblait donc devoir se prêter aisément à nos expériences. Sa solubilité dans l'eau est de 44,15 g de sel anhydre pour 100 ml.

Nous avons commencé par préparer une solution M/50 en Fe^{+++} dans l'eau distillée. L'addition de 0,2 ml de cette solution à 1 ml de globules rouges mis en suspension dans 20 ml de CI Na isotonique provoque une agglutination immédiate des hématies. Pour préciser la concentration limite d'agglutination, nous avons dilué cette solution ferrique au dixième et nous avons renouvelé notre essai vis à vis des hématies avec des quantités allant de 2 à 0,2 ml. de solution ferrique M/500. Nous avons obtenu aucun effet, et pourtant 2 ml à M/500 = 0,2 ml à M/50.

Nous nous sommes aperçu que la solution M/50 se troublait très rapidement et le fer qui prend la forme $2 \text{ Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{SO}_3$ est inopérant. Nous avons renouvelé nos essais en utilisant la solution dès sa préparation sans meilleurs résultats. Au contraire, la solution préparée avec 0,2 ml de solution M/50 était beaucoup plus stable. En conséquence, nous avons toujours utilisé sans dilution préalable la solution M/50 qui nous apparaissait comme la plus faible concentration en fer possédant une stabilité suffisante. Nous sommes obligé évidemment, vu la concentration élevée de cette solution, d'en prélever de faibles quantités, ce qui un inconvénient pour la fidélité des expériences si on n'y apporte pas tout le soin nécessaire.

Avant de poursuivre nos essais, nous avons déterminé la stabilité exacte de la solution M/50 diluée dans le volume constant de 20 ml pour éviter qu'une précipitation éventuelle ne faussât les conditions des expériences et les calculs puisque le métal qui aurait précipité spontanément (comme cela a lieu dans la solution de sel de Mohr) risquerait d'être compté comme le fer s'étant lié à un substrat biologique.

Nous avons donc complété au volume de 20 ml des quantités croissantes de solution M/50 et nous avons dosé le fer dans chacune de ces dilutions après centrifugation à des temps fixes variant de quelques minutes à plusieurs heures.

Nos résultats figurent dans le tableau :

Fer ⁺⁺⁺ apporté à la concentration M/50 et restant en solution dans un volume total de 20 ml après des temps variables. (Résultats exprimés en µg/ml.)						
Fer apporté	11,8	13,5	24,4	35	48	115
Fer restant en solution						
après 10 mn.						115
15 mn.						110
30 mn.	11		24,4	36	31	89
45 mn.			24	25,4	28	80
1 h.	11,8	13,8	24	25	24	76
2 h.	10	11	17,3	21	21	80
3 h.	3,7	4,5	10,6	15	20	70
4 h.		3,5				
6 h.	3,2	2,2	5,7	11	18	
9 h.		1,9				
18 h.						68
24 h.		1,75				
48 h.	1,2					
3 j.		1,25				

Le trait en pointillé indique le temps à ne pas dépasser pour que le sel reste stable.

Nous voyons qu'entre le moment où le fer est ajouté à la suspension globulaire et le moment où on interrompt le contact avec les hématies par une centrifugation et le prélèvement du liquide surnageant pour y doser le métal, il ne devra pas s'écouler plus de :

1h.	pour des quantités de fer ne dépassant pas	24,4 µg.
30 min.	-	35 µg.
10	-	115 µg.

Nous avons utilisé le chlorure de sodium pour obtenir l'isotonie indispensable dans nos expériences. On sait que l'hydrolyse du chlorure ferrique est favorisée par la chlorure de sodium tandis qu'elle est retardée pour le potassium, mais le choix du chlorure de sodium s'imposait puisqu'en présence d'hématies, nous devions établir un milieu artificiel se rapprochant du milieu normal. La stabilité de la solution d'alun s'en est peut être trouvée diminuée, mais les temps de stabilité que nous venons de déterminer nous mettaient à l'abri du danger d'hydrolyse.

Cette difficulté à obtenir des solutions stables de fer expliquent que ce dernier figure rarement dans les travaux sur les ions métalliques, nous n'aurons de ce fait que peu de références expérimentales à citer au cours de notre travail.

Rappelons qu'une conséquence de l'hydrolyse des sels de fer sa présence dans l'organisme soit sous forme d'hydroxyde (ferritine) soit sous forme de complexes chélatés de très haute stabilité (porphyrine).

E - COMPARAISON DES EFFETS MACROSCOPIQUES DU FER ET DE QUELQUES AUTRES METAUX SUR LES HEMATIES

Nous avons utilisé les sels métalliques suivants mis en solution M/10 (sauf pour le fer M/20)

Nitrate de Plomb	$\text{Pb} (\text{NO}_3)_2$	3,31 g p. 100
Chlorure de Manganèse	$\text{Mn Cl}_2, 4 \text{ H}_2\text{O}$	1,98
Sulfate de zinc	$\text{Zn SO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	2,88
Nitrate d'Argent	Ag NO_3	1,70
Chlorure mercurique	Hg Cl_2	2,71
Sulfate de Cadmium	$3\text{Cd SO}_4 8 \text{ H}_2\text{O}$	2,57
Chlorure de Nickel	$\text{Ni Cl}_2 5 \text{ H}_2\text{O}$	2,20
Chlorure d'Or (*)	Au Cl_4	3,03
Sulfate de Cuivre	$\text{Cu SO}_4, 5 \text{ H}_2\text{O}$	2,50
Chlorure de Cobalt	$\text{Co Cl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$	2,38
Sulfate de fer et d'ammonium	$\text{Fe} (\text{SO}_4)_3, (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, 24 \text{ H}_2\text{O}$	2,41

Ces solutions sont préparées avec les solutés isotoniques de NaCl ou NaNO_3 (page 7)

(*) Nous avons utilisé en chloriaurate de sodium.

1 - Effets directs des sels métalliques sur les hématies

Nous avons observé l'aspect macroscopique présenté par la suspension d'hématies (1 ml de globules rouges) mise en présence des divers sels métalliques. On peut classer ceux-ci en 3 catégories suivant qu'ils entraînent l'agglutination, l'hémolyse ou bien laissent intacte la suspension globulaire.

On connaît depuis longtemps cette diversité de comportement ; nous avons voulu l'examiner de façon plus précise en opérant dans des conditions identiques dans tous les essais, suivant le protocole indiqué précédemment.

a) agglutination

Fer (alun de fer)

Des quantités de fer progressivement décroissantes sont mises en contact avec 1 ml d'érythrocytes, Fe^{+++} est apporté sous des volumes s'échelonnant entre 0,2 ml et 0,05 ml de solution M/50, soit de 226 à 56,5 μg .

L'agglutination est immédiate avec 0,2 ml ; en dessous on observe d'abord une sédimentation accélérée et la formation d'un culot d'hématies ; au microscope l'agglutination est visible, elle le devient à l'oeil nu un peu plus tard.

La limite d'activité se trouve à 0,08 ml soit 90 μg . Au delà, il n'y a plus d'effet sur les hématies.

Contrairement à l'agglutination obtenue avec Cu^{++} , l'agglutination provoquée par Fe^{+++} s'accompagne rapidement pour les hautes doses, plus lentement (parfois 12 h) avec des doses plus faibles mais encore actives, d'une hémolyse. Ce qui signifie que Fe^{+++} altère les hématies.

Notons, à propos de cette action hémolysante, que les sels ferreux sans effets sur les hématies à température ordinaire possèdent aussi cette action hémolysante quand la température s'élève, d'où l'hémolyse observée chez le mammifère (14).

Cet effet peut se manifester in vivo si bien qu'on a pu dire que "son emploi" n'est pas sans danger en médecine (113).

Cuivre

Nous n'insisterons pas sur l'action du cuivre longuement étudiée par TAVERNIER. Nous rappellerons seulement que, sauf le cas d'hématies particulièrement fragiles ou traumatisées, l'agglutination n'entraîne pas d'hémolyse ultérieure (147).

Le cuivre (SO_4Cu) agglutine 1 ml de globules rouges, dans les conditions indiquées, à la concentration limite de 0,5 ml de solution M/500, soit 63,5 μg .

Le cuivre est donc un peu plus actif que le fer.

Plomb

L'expérience doit être faite en milieu rendu isotonique par du NO_3Na . Les hématies ont donc lavées dans des solutions de ce dernier sel.

La concentration limite active est 2 ml de solution M/500 soit 828 μg .

Zinc

La limite d'activité est 3 ml de solution M/100 soit 1960 μg .

Cadmium

Le cadmium se montre beaucoup moins actif que les cations précédents et nous avons dû utiliser plus de 10 ml de solution M/10 pour obtenir l'agglutination.

Nous avons remarqué que la forte densité de cette solution, préparée avec le soluté de Cl Na à 8,5 p. 1000, empêchait les hématies de se disperser rapidement : ajoutées dans le tube contenant la solution, elles restaient dans la partie supérieure tant que l'ensemble n'avait pas été mélangé par agitation.

La solution était en effet hypertonique.

Nous avons alors préparé une solution isotonique en nous basant sur l'équivalence d'une solution à 76 g de sulfate de cadmium. La solution M/10 contenant 25,7 g p. 1000 équivaut à 3 g de Cl Na et pour avoir l'isotonie il faut ajouter seulement 5,5 g de Cl Na p. 1000.

Cette solution de SO_4Cd vraiment isotonique produit l'agglutination à partir de 2 ml⁴ (soit 22,48 mg) mais de façon très lente.

b) Hémolyse

Mercure

La lecture faite 12 heures après la mise en contact des hématies et du sel métallique place la dose limite active à 1 ml de solution M/5000 (soit 40 μg).

Or

La limite d'hémolyse est obtenue avec 0,5 ml de solution M/5000 (lecture faite après 12 h.).

Argent

Comme pour le plomb, l'expérience est faite en milieu rendu isotonique par NO_3Na . La dose limite active est 2 ml de solution M/50 (soit 4,28 mg)

Cette hémolyse est toujours accompagnée d'une action dénaturante sur l'hémoglobine. Une coloration brune apparaît rapidement.

En augmentant les quantités de métal, l'hémolyse ne se produit plus car il y a coagulation des hématies profondément altérées et le magma brunâtre se rassemble au fond des tubes laissant une liqueur surnageante incolore parfois troublée par les protéines détachées des hématies. Il y a une véritable défécation.

c) Aucun effet

Aucun effet sur les hématies n'a été observé en utilisant plusieurs ml de solution M/50 de sels de Ni - Co - Mn.

Nos essais classent donc les ions métalliques actifs sur les hématies dans les conditions indiquées en deux groupes et dans un ordre d'activité décroissante.

Agglutination :	Cu^{++}	Fe^{+++}	Pb	Zn	Cd
Hémolyse	Au	Hg	Ag		

La liste établie pour l'agglutination par JANDL & SIMMONS (79) suit l'ordre :

$\text{Cu}^{++} > \text{Fe}^{+++} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Ag} > \text{Au} > \text{Ni} > \text{Cd} > \text{Mn} > \text{Co} > \text{Hg}$

et l'hémolyse est notée pour $\text{Ag}, \text{Hg} > \text{Au} > \text{Cd}$

Les différences avec nos propres observations portent d'une part sur la place respective de Pb et de Zn qui est interchangée, d'autre part sur l'indication d'une action agglutinante de Ag - Au - Ni - Mn - Co - Hg.

Nous n'avons pas voulu considérer dans nos expériences l'agglutination qui s'accompagne d'une altération des hématies ; quant à l'action de Ni - Mn - Co, nous nous sommes limité à une concentration M/10, c'est-à-dire 10 fois supérieure à celle du cuivre et du plomb, alors, que JANDL & SIMMONS indiquent une activité environ 100 fois plus faible.

2 - Intervention des sels métalliques dans l'hémolyse provoquée par d'autres agents.

Notre attention a été attirée par des observations portant sur l'influence de divers métaux sur l'hémolyse des hématies provoquée par d'autres agents.

a) Hémolyse par l'éther

Dans les travaux de WATERMANN (1921) que rapporte HEUBNER (73) le bichlorure de mercure se distingue nettement des chlorures de cuivre, de zinc, de cadmium vis-à-vis de l'action hémolysante de l'éther sur les hématies. Le cuivre, le zinc et le cadmium empêchent l'hémolyse d'une suspension à 10 % de globules rouges de cheval dès la concentration de 0,01 p; 100, alors qu'il faut une dose 25 fois plus forte de mercure pour produire une inhibition analogue ; les concentrations plus faibles favorisent au contraire l'hémolyse. Cette observation correspond d'ailleurs bien aux effets agglutinants du cuivre, du zinc, du cadmium et à l'action fixatrice des fortes doses de mercure.

b) Hémolyse par le glycérol

WILBRANDT (160) décrivant le ralentissement de l'hémolyse de globules rouges de Rat provoquée par le glycérol cite au contraire dans l'ordre d'activité inhibitrice décroissante :

$\text{Hg Cl}_2 \rangle \text{Cu Cl}_2$, puis d'activité très faible $\text{Ni} \rangle \text{Co} \rangle \text{Zn}$

Le point intéressant est l'hypothèse de l'auteur pour expliquer cette action commune ; l'agglutination protectrice a lieu quand le pH égal au départ à 7 est devenu acide. Le parallélisme entre l'effet protecteur et l'acidification fait penser à une même modification de la membrane consistant en un changement de pH au niveau même de cette membrane par formation d'un complexe métallique non dissocié.

c) Hémolyse par l'uréthane

Contrairement aux observations précédentes c'est une action favorisante des métaux dans l'hémolyse par l'uréthane qu'ont mise en évidence RUGE et RUMMEL (132).

Ces auteurs ont montré que de nombreux ions métalliques favorisaient, à des concentrations très faibles, l'hémolyse par l'uréthane. Autrement dit, tous les métaux essayés se comportaient de façon identique.

Il nous a donc paru intéressant de reprendre ces expériences pour des métaux dont l'action propre sur les hématies était différente puisqu'elle se traduisait par l'agglutination, l'hémolyse ou les deux phénomènes. Nous avons choisi le cuivre, le fer, l'or et le mercure (18).

Dans des tubes à essai, nous avons mis en présence : les hématies, l'uréthane et le métal à essayer.

Nous partons d'une suspension d'hématies à 1 %. à cette dilution, nous pensons avoir des globules bien séparés donc une surface constante. Nous avons constaté des différences très grandes de sensibilité entre les lots d'hématies utilisés ; ces différences nous paraissent être dues en particulier à la durée de conservation des hématies. Le test de résistance globulaire classique que nous pensions pouvoir employer pour vérifier l'état des hématies s'est montré insuffisamment sensible pour déceler une différence entre les lots : il nous a toujours donné les mêmes résultats alors que nos expériences démontraient une fragilité plus ou moins grande. Il faut donc pour chaque série d'expériences opérer avec les mêmes globules rouges et faire des témoins pour avoir des résultats comparables.

Nous avons préparé une solution d'uréthane à 20 % et nous avons recherché une concentration finale qui provoque une hémolyse dans les temps faciles à observer, c'est-à-dire ni trop courts car les différences ne seraient pas appréciables, ni trop longs. Cette solution est préparée extemporanément. Vu la forte concentration, il faut toujours veiller à sa parfaite homogénéité. La précision dans les mesures est un facteur important car les différences de 0,1 ml provoquent des variations du temps d'hémolyse de l'ordre de 20 minutes.

Les solutions métalliques contiennent au départ un ion gramme (Ig) de métal par litre ceci afin de nous placer dans les conditions de RUGE et RUMMEL. Nous avons poussé certains essais jusqu'à 10^{-12} I g p. 1000, mais pour certains métaux seulement car il y a, à ces concentrations, de nombreuses causes d'erreur : par exemple, pour le fer, il est inutile de préparer des dilutions aussi grandes car nous avons calculé que dans chaque essai d'un volume final de 10 ml NaCl peut introduire à lui seul du fer à une concentration de 10^{-7} I g. 1000 (il en est d'ailleurs de même pour le plomb).

On juge l'hémolyse totale lorsque le liquide est parfaitement limpide. Si le temps d'hémolyse est trop long, on la suit à intervalle régulier au photomètre.

Dans les expériences où la concentration métallique était relativement élevée, nous avons essayé de tamponner nos solutions à pH 7,2. Nous avons remarqué que cela allongeait parfois considérablement nos temps d'hémolyse, démontrant qu'il ne fallait pas oublier le rôle du pH non plus que la combinaison possible des métaux au tampon. Aux faibles concentrations métalliques, l'utilisation d'un tampon est, de plus, inutile, c'est pourquoi, nous avons pratiqué nos essais en simple solution isotonique.

Technique

On mélange les solutions suivantes dans les proportions indiquées :

- solution d'uréthane à 20 % 3,4 ml
- soluté isotonique de Cl-Na 4,6
- solution métallique 1
- hématies à 1 % 1

On prépare en outre deux témoins contenant l'un la solution d'uréthane seule (3,4 ml), l'autre la solution métallique seule (1 ml) mises en présence de la suspension d'hématies.

Résultats

Fer

Le fer par lui-même est hémolysant à 10^{-4} . Les concentrations $5 \cdot 10^{-3}$ et davantage sont dénaturantes.

Nous avons comparé l'activité de solutions fraîchement préparées à celle de solutions plus vieilles où s'était formé un trouble. Nous n'avons pas remarqué de différence sensible entre ces deux solutions dans cette technique d'hémolyse en présence d'uréthane. Nous avons remarqué au contraire que l'action agglutinante du métal est très diminuée lorsque le sel s'hydrolyse.

Cuivre

Le cuivre accélère nettement l'hémolyse à partir de 10^{-4} et jusqu'à 10^{-8} .

Or

L'or a une action sur l'hémolyse jusqu'à 10^{-10} avec certains lots d'hématies jusqu'à 10^{-12} .

Dans les expériences où la concentration métallique était relativement élevée, nous avons essayé de tamponner nos solutions à pH 7,2. Nous avons remarqué que cela allongeait parfois considérablement nos temps d'hémolyse, démontrant qu'il ne fallait pas oublier le rôle du pH non plus que la combinaison possible des métaux au tampon. Aux faibles concentrations métalliques, l'utilisation d'un tampon est, de plus, inutile, c'est pourquoi, nous avons pratiqué nos essais en simple solution isotonique.

Technique

On mélange les solutions suivantes dans les proportions indiquées :

- solution d'uréthane à 20 % 3,4 ml
- soluté isotonique de Cl-Na 4,6
- solution métallique 1
- hématies à 1 % 1

On prépare en outre deux témoins contenant l'un la solution d'uréthane seule (3,4 ml), l'autre la solution métallique seule (1 ml) mises en présence de la suspension d'hématies.

Résultats

Fer

- Le fer par lui-même est hémolysant à 10^{-4} . Les concentrations 5.10^{-3} et davantage sont dénaturantes.

Nous avons comparé l'activité de solutions fraîchement préparées à celle de solutions plus vieilles où s'était formé un trouble. Nous n'avons pas remarqué de différence sensible entre ces deux solutions dans cette technique d'hémolyse en présence d'uréthane. Nous avons remarqué au contraire que l'action agglutinante du métal est très diminuée lorsque le sel s'hydrolyse.

Cuivre

Le cuivre accélère nettement l'hémolyse à partir de 10^{-4} et jusqu'à 10^{-8} .

Or

L'or a une action sur l'hémolyse jusqu'à 10^{-10} avec certains lots d'hématies jusqu'à 10^{-12} .

Mercure

L'action accélérante du mercure sur l'hémolyse se manifeste jusqu'à 10^{-10} et, comme avec l'or, parfois au-delà avec des lots de globules rouges très sensibles.

Voici un exemple d'hémolyse par l'uréthane seule et en présence des quatre métaux envisagés :

temps d'hémolyse en minutes		
Uréthane	110	
Uréthane + Métal	concentration du métal en Ion-g p. 1000	
	10^{-4}	10^{-6}
Mercure.....	5	20
Or	illisible	45
Cuivre.....	7	80
Fer	7	110

A la concentration 10^{-4} , fer et cuivre se montrent donc à peine moins inhibiteurs que le mercure, tandis que l'or provoque une dénaturation immédiate.

Les différences entre les 4 sels métalliques sont beaucoup plus nettes à la concentration plus faible 10^{-6} . Le temps d'hémolyse en présence de mercure, or, cuivre est réduit respectivement à 18 - 41 - 72 % de sa valeur initiale. Le fer à cette concentration se montre sans effet.

Par ordre d'activité décroissante sur l'hémolyse par l'uréthane les quatres ions métalliques se rangent suivant la séquence :



soit une action plus marquée pour les métaux très hémolysants par eux-mêmes.

Nous avons essayé d'évaluer approximativement le pourcentage de surface globulaire occupée par les ions métalliques dans ces essais.

Dans chaque épreuve, nous utilisons environ 10^8 globules rouges ayant chacun une surface moyenne de $163 \mu^2$ (d'après le modèle de PONDER) soit une surface totale de $1,63 \text{ dm}^2$.

En considérant une des faibles concentrations métalliques encore actives dans certains cas, par exemple 10^{-7} ion g p. 1000, nous avons en solution environ $6,10^5$ ions métalliques par hématie. En supposant qu'en solution les ions soient sphériques et qu'ils aient la même taille que dans les cristaux où ils sont à l'état ionique, la projection sur la membrane globulaire d'un de ces ions sphériques occupera en moyenne 3.10 Å^2 . De là, on peut approximativement calculer le pourcentage de surface globulaire occupée par les ions métalliques à la concentration 10^{-7} soit 0,01 p. 100 c'est-à-dire 1/10 000 de la surface en supposant qu'il n'y ait qu'une seule couche d'ions.

Ces résultats sont évidemment très approximatifs, mais prouvent l'encombrement minime de l'hématie par le métal alors que l'uréthane se trouve en quantité considérable.

Nous en rapprocherons d'ailleurs les indications fournies par JACOBS (77) à propos de l'inhibition du passage du glycérol à travers la membrane globulaire. Les atomes de cuivre couvrent environ 1/2000 de la surface totale cellulaire et cependant la perméabilité au glycérol diminue de 90 p. 100 de sa valeur initiale.

3 - Essai d'interprétation

Les effets macroscopiques des ions métalliques sur l'hématie semblent impliquer nécessairement une intervention du métal au niveau de la "membrane". Parmi les recherches faites sur ce sujet nous avons tenté de rassembler les plus importantes pour voir si agglutination et hémolyse pouvaient être rapportées à des réactions connues des sels métalliques sur divers constituants globulaires. Ces réactions pourraient éventuellement expliquer l'ordre d'activité établi expérimentalement.

LAURELL (92) s'est demandé si les hématies avaient une capacité de liaison analogue à celle du plasma. Mais n'utilisant que les hémolysats, il élimine une partie importante des globules et sa technique est, à notre avis, entachée d'erreurs. Les résultats négatifs obtenus n'ont donc pas de valeur certaine.

Plus intéressantes sont des expériences récentes concernant particulièrement le zinc, le cadmium, le plomb, le cuivre.

SIVARAMA & coll. (140) ont étudié le comportement du zinc marqué vis-à-vis de globules rouges de cheval, dans des conditions analogues aux nôtres. Ils constatent que la fixation du zinc est stoppée au bout de quelques heures quand on utilise des hématies entières, tandis qu'elle est beaucoup plus importante à la fois

sur les globules préalablement soumis à l'hémolyse (donc les stromas) et dans les hémolysats. C'est donc que la membrane fait barrière. Cet effet de surface se traduit d'ailleurs par l'agglutination.

Les résultats de cette expérience prouvent donc que le zinc mis au contact d'hématies se fixe sur la membrane et qu'il peut aussi se fixer sur l'hémoglobine. C'est la liaison du zinc aux groupements imidazols qui jouerait probablement dans sa fixation sur la membrane (27).

Le cadmium injecté au lapin se trouve pour la plus grande part lié à l'hémoglobine (29). Son affinité pour le stroma est donc plus faible et ainsi s'explique le faible pouvoir agglutinant que nous avons trouvé.

TAVERNIER a montré que la presque totalité du cuivre retenu in vitro par des hématies était enlevé par EDTA si bien que les hématies agglutinées reprennent un aspect normal. Comme il est connu que EDTA ne pénètre pas dans les cellules (56) cette expérience prouve que le cuivre reste en surface.

En ce qui concerne le plomb, des modifications importantes de la surface globulaire ont été mises en évidence tandis que l'hémoglobine n'est pas touchée (4).

L'analyse révèle cependant que du plomb peut se retrouver dans un hémolysat, mais en quantité beaucoup plus faible que dans les stromas correspondants (57). D'autre part, EDTA peut détacher 90 p. 100 du plomb fixé sur des hématies (153).

Des fractions de globules rouges, stromas simples ou stromas débarrassés de lipides ont été mis en compétition avec des globules rouges entiers pour déceler une affinité éventuellement différente (153). Alors que les stromas simples contournent les hématies dans la fixation du plomb, les stromas délipidés se montrent inactifs. Ceci suggère nettement un rôle des constituants lipidiques dans la rétention du métal par les stromas.

Quant aux cations hémolysants, le mercure a fait l'objet d'une quantité considérable de publications, nous citerons seulement celles de JUNG (83) et MENEGHETTI (108) déjà anciennes, mais qui contiennent un grand nombre d'observations.

L'examen microscopique des hématies "fixées" par les sels métalliques révèle une surface lisse en présence de mercure tandis qu'elle est granuleuse dans le cas du Cu - Fe - Pb - Ag - Au - Ni Co. L'action du mercure paraît donc différente de celle des autres cations, même hémolysants ; on l'a attribuée à sa liposolubilité (73) ; cette hypothèse n'a reçu ni infirmation ni confirmation mais

l'intervention possible des lipides récemment envisagée dans la fixation du plomb, comme nous l'avons rapporté plus haut, constitue peut être un début de confirmation du rôle des lipides dans l'action du mercure.

L'hémolyse par les sels d'argent a été aussi très étudiée (73). Une fixation en surface a été décrite. Il s'y ajouterait une liaison à l'hémoglobine en présence d'une forte concentration de métal.

Tandis que la liaison du cadmium à l'hémoglobine signalée plus haut reste insoupçonnée dans nos expériences, il est par contre évident que l'argent, le mercure et l'or réagissent étant donné le brunissement des globules.

Autant qu'on puisse rapprocher la membrane de l'hématie de celle des bactéries, l'influence d'agents mouillants sur l'activité de préparations métalliques rapproche aussi le mercure et l'argent et les oppose au plomb, au cuivre, au fer et au zinc puisque seuls l'argent et le mercure ont leur action diminuée par un mouillant tandis que l'action des autres métaux est augmentée (24).

Les effets macroscopiques des ions métalliques sur l'hématie s'accompagnent sans aucun doute de modifications locales biochimiques liées à la perméabilité. C'est pourquoi nous nous sommes demandé si les observations de VINCENT & BLACK-BURN (154) sur la perte de potassium des hématies sous l'effet de certains ions métalliques ne traduiraient pas sous un autre aspect les causes de l'agglutination et de l'hémolyse. S'il en était ainsi on devrait observer des séquences d'activité assez voisines. Or, voici les résultats de ces deux auteurs :

A une température de 37° et à la concentration de $0,67 \mu$ moles par ml de globules rouges, les chlorures métalliques provoquent une sortie de potassium, dans l'ordre d'activité décroissant :



le plomb présentant une activité nettement supérieure aux autres métaux.

Par contre, Co, Ni, Mn, Fe^{+++} n'ont aucun effet même à des concentrations s'élevant jusqu'à 2μ moles (*). A cette dernière dose, le fer entraîne bien une perte de potassium, mais elle est due à l'hémolyse. Les métaux inactifs seraient ceux qui ne se lient pas aux groupements thiols.

(*) Ni et Mn prenant rang dans des séries plus longues, mais Fe se montre toujours inactif (155).

Cet ordre d'activité ne correspondant pas à celui que nous avons déduit de l'action propre des métaux, agglutinante ou hémolysante, (21) cependant, comme dans nos expériences sur l'hémolyse par l'uréthane, le fer se montre inactif (page 21)

VINCENT & BLACKBURN constatent que leurs résultats "donnent peu de lumière sur le problème général du lieu de fixation dans l'adsorption sur la surface cellulaire. Cet ordre n'a pas de relation avec les séries d'affinité établies dans l'interaction métaux-protéines il peut donc être suggéré soit que les métaux se lient à des sites différents, soit que leur affinité pour les globules n'est pas en relation avec leur affinité pour les composants cellulaires. Il est possible que la plus grande activité de Hg et Pb soit due à une affinité hautement spécifique."

Ces expériences n'apportent donc aucun éclaircissement sur les lieux d'action des métaux sur les hématies qui ne font l'objet que d'hypothèses.

JANDL & SIMMONS (79) pensent que les métaux divalents seraient liés à la surface globulaire par les groupements carboxyles car l'agglutination est inhibée par la présence de substances contenant ces groupements, et est inhibée également par acidification.

Par ailleurs, l'histidine (dont on a démontré la présence dans la membrane érythrocytaire, en temps que groupement terminal d'une chaîne polypeptidique) s'est vue attribuer une responsabilité dans le passage du glycérol à travers la membrane, passage inhibé par les métaux lourds comme nous l'avons dit. De ce fait, elle a été considérée comme un élément de fixation des ions métalliques (143). L'histidine est d'ailleurs l'acide aminé qui inhibe le plus fortement la fixation du zinc sur les hématies (27) (158)

En résumé, on ne connaît rien du mode de liaison des sels métalliques avec les constituants globulaires. Dans l'état actuel de nos connaissances, il est donc difficile de préciser le ou les mécanismes d'intervention des sels métalliques.

Cependant, en dehors de l'effet de surface dans l'adsorption des métaux par les hématies, le rapprochement qu'on n'a pas manqué de faire entre l'agglutination des hématies et la précipitation des protéines nous permettra de reprendre cette discussion ultérieurement.

F - FIXATION DU FER SUR LES HEMATIES

Dans leurs études sur l'agglutination des globules rouges et sur la fixation du cuivre, nos prédécesseurs au Laboratoire (17) (147) ont toujours mis en suspension 1 ml d'hématies dans 20 ml de liquide ayant trouvé que cette dilution était la plus satisfaisante pour l'observation et les dosages.

De ce fait, nous avons conservé ce protocole, mais il nous a paru intéressant de voir au préalable si le volume où se fait l'expérience intervenait dans le taux de fixation du métal.

1 - Variation de la quantité de fer fixé en fonction de sa concentration.

Dans ce dessein, nous avons offert 112 μg de fer (sous forme d'alun ferrique) à une même quantité d'hématies (1 ml) dispersées dans un volume de solution chlorurée isotonique variant de 5 à 20 ml. La fixation du fer dans ces conditions figure dans le tableau suivant :

Volume de solution En ml	20	16	12	10	8	5
Fer fixé en μg						
Essais N° 1	68,5	82	87,3	90,4	94	95,2
N° 2	78,5	-	86	92,9	93,5	94

La fixation augmente quand le volume de dispersion décroît. Pour comparer entre elles des expériences, il est donc nécessaire d'opérer toujours sous un même volume.

2 - Variations de la quantité de fer fixé en fonction de la quantité de fer.

Nous avons fait six séries d'expériences dans lesquelles nous avons mis en oeuvre des quantités de fer allant de 52 μg à 672 μg . Le volume des globules rouges est toujours de 1 ml. Le volume liquide dans lequel se fait la fixation est de 20 ml (dans lesquels le millilitre de globules ne compte évidemment pas). Nous avons limité le temps de fixation à 5 minutes (pour les raisons que nous indiquons p17)

Expérience n° 1

Fer offert en μg , 112	224	280	336	392	448	504	560	672
Fer fixé en μg . 92	184	180	196	192	188	180	196	206

Expérience n° 2

Fer offert en ug	60	80	100	120	150	180	206	262
Fer fixé en ug	16	32	64	90	132	156	190	212

Expérience n° 3

Fer offert en ug	60	80	100	120	150	180	206	262
Fer fixé en ug	50	62	78	82	102	100	(90)	122

Expérience n° 4

Fer offert en ug	56	84	112	140	168	196	224	280
Fer fixé en ug	30	54	88	116	144	172	198	230

Expérience n° 5

Fer offert en ug	52	78	104	156	208	260	310	412
Fer fixé en ug	34	64	84	108	144	146	136	118

Expérience n° 6

Fer offert en ug	52	104	156	206	310	412
Fer fixé en ug	12	54	144	196	190	220

La diversité des résultats qui est évidente, n'est pas due à des erreurs ou des imprecisions dans notre technique : dans l'expérience n° 6, nous avons dosé le fer retenu sur les hématies. Après un lavage superficiel au soluté isotonique de chlorure de sodium, le culot est remis en suspension dans 10 ml de soluté isotonique et traité par 5 ml HCl 6 N et 10 ml CCl_3COOH ; le dosage a donné les résultats suivants :

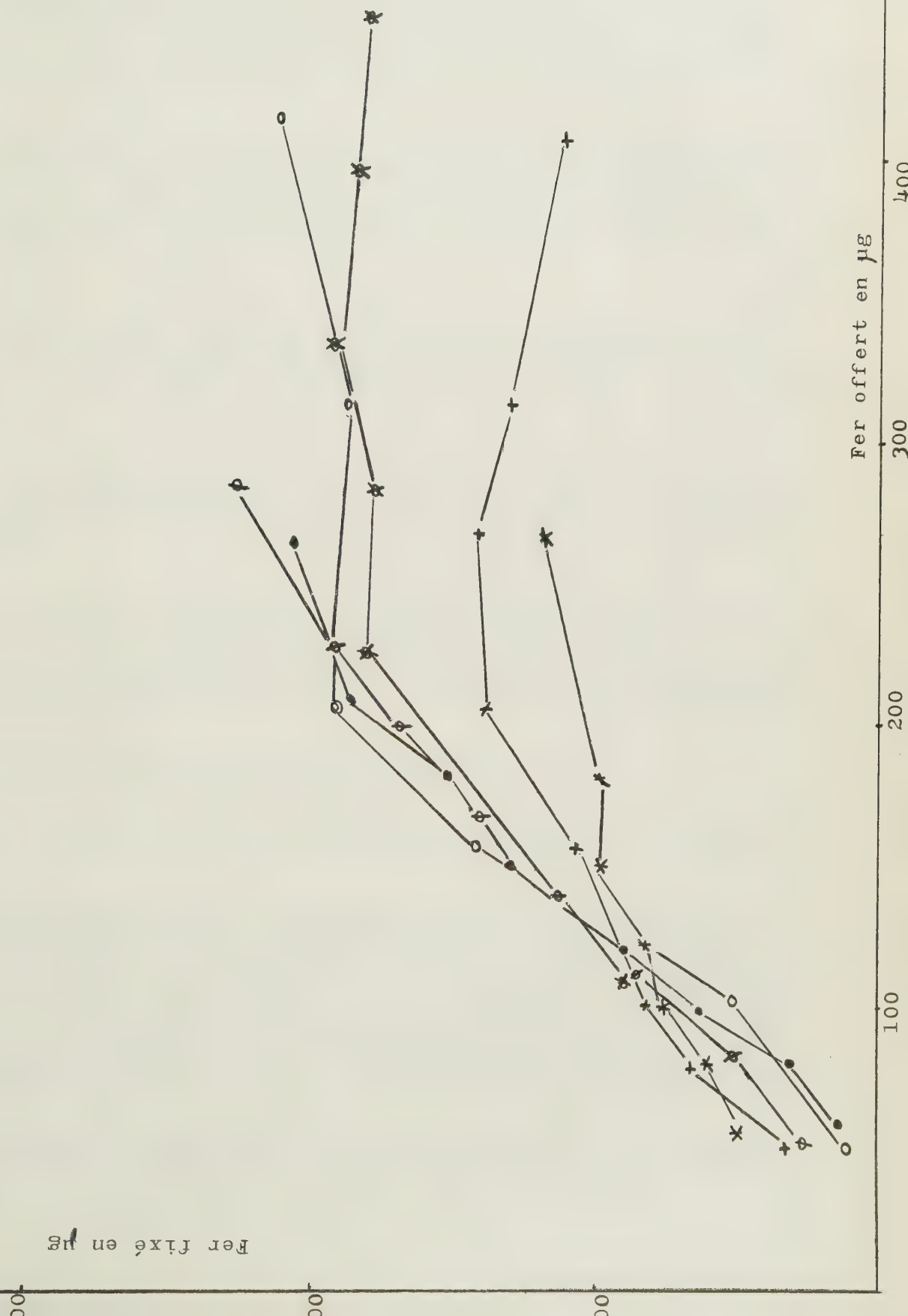
- fer retrouvé dans les érythrocytes en ug	132	193	226
- fer disparu de la solution surnageante	144	196	220

(dosage ci-dessus)

La concordance entre le fer disparu de la solution ferrique mise au contact des globules, et le fer retrouvé sur les hématies est excellente.

Pour faciliter l'interprétation des résultats de ces 6 séries d'expériences nous avons rassemblés sur un seul graphique (page 32).

Quantité de fer fixé par 1 ml d'hématies
 en fonction de la quantité de fer offert



Ce graphique met en évidence qu'il y a proportionnalité entre la quantité de fer fixé et de fer offert tant que la quantité de fer offert est inférieure à 200 μg . Ensuite, il y a divergence entre les courbes représentatives, montrant une irrégularité de fixation, fixation qui est par ailleurs limitée.

L'irrégularité de taille des agglutinats, irrégularité visible macroscopiquement à partir des doses de fer voisines de 200 μg , pourrait expliquer les divergences entre les courbes obtenues avec des quantités de fer supérieures à ces valeurs. En effet; l'apparition de ces agglutinats diminue la surface totale des hématies et dissimule les lieux de fixation.

Afin de vérifier cette hypothèse la limitation de fixation du fer par une diminution de la surface adsorbante, nous avons dans les mêmes conditions opéré une fixation de fer sur une matière ne pouvant subir d'agglutination : la cellulose du papier filtre.

Il n'est pas possible d'évaluer la surface réelle d'un fragment de papier filtre et nous n'avons pu calculer la quantité de cellulose dont la surface aurait été celle de 1 ml d'hématies soit 1,70 m².

Nous avons choisi comme référence un poids déterminé de papier. La surface apparente est respectivement de 150 cm² pour 1 g et 75 cm² pour 0,50 G. Nous plaçons le papier filtre coupé en petits morceaux de 1 cm² environ dans 20 ml de soluté isotonique contenant 100 μg de fer. Les essais faits en double donnent les résultats suivants :

0,50 g de papier fixe 42 et 44 μg de fer
1 g de papier fixe 86 et 92 μg de fer

La fixation est exactement proportionnelle à la surface.

Si nous comparons la fixation du fer sur les hématies à celle du cuivre qu'a étudié TAVERNIER (147) nous constatons une notable différence. Dans les mêmes conditions que les nôtres, les érythrocytes fixent jusqu'à 1390 μg de cuivre sur les 1500 qui leur sont offerts tandis que nous n'avons pu fixer plus de 220 μg de fer. Il est vrai que l'action du fer paraît plus brutale que celle du cuivre et de ce fait ne laisse sans doute pas aux hématies le temps de fixer autant de fer que de cuivre avant de s'agglutiner, le cuivre ayant une action plus progressive.

Cependant il est aussi permis de penser que la fixation de ces deux métaux ne procède pas d'un même mécanisme.

Dans cette perspective, nous nous sommes demandé quelle part prenait le stroma dans la fixation du fer.

Fixation du fer sur les stromas

Les stromas sont obtenus par des lavages répétés à l'eau distillée de 1 ml de purée globulaire et sont ensuite mis en suspension dans l'eau salée isotonique. Voici deux essais comparatifs de la fixation sur les hématies et sur leurs stromas.

1ère Expérience

Fer offert en μg	52	104	208	416
Fer fixé par 1 ml d'hématies	34	84	144	(200)
par les stromas de 1 ml des mêmes hématies	34	48	68	96

2ème Expérience

Fer offert en μg	52	104	136	206	310	412
Fer fixé par 1 ml d'hématies	12	54	144	196	199	220
par les stromas de 1 ml des mêmes hématies	38	64	76	75	94	116

La fixation sur stromas augmente en fonction du fer offert comme sur les hématies, mais l'augmentation progresse plus faiblement (TAVERNIER l'avait déjà remarqué pour le cuivre). Cette progression est en faveur d'un phénomène de surface, les stromas ont effectivement une surface moindre que les hématies dont ils proviennent.

Fait remarquable, les stromas subissent sous l'action du fer une agglutination macroscopique analogue à celle qu'on observe avec les hématies.

3 - Variation de la quantité de fer fixé en fonction du temps

Nous avons établi précédemment le temps de contact maximum de la solution de fer avec les hématies, compatible avec la stabilité de la solution ferrique.

Nous avons cherché si dans ce temps limité, il y avait fixation immédiate ou progressive de fer. Dans ce but, nous avons mis en contact avec les hématies 0,25 ml de solution de fer environ M/50 dont la dilution dans les conditions expérimentales décrites a une stabilité d'une heure.

Voici deux essais :

	Essai 1	Essai 2
Fer offert à 1 ml d'hématies en μg	280	260
Fer fixé dès le mélange	180	
après 5 min	185	
15 -	190	132
30 -	184	145
45 -	185	
60 -		140

La fixation est pratiquement immédiate donc indépendante du temps de contact avec les hématies dans la limite de stabilité de la solution de fer employée. Cette fixation instantanée met à l'abri d'erreurs dues à des temps de contact plus ou moins variables. Rappelons que le cuivre se fixe moins rapidement que le fer et que son taux de fixation augmente légèrement avec le temps (147).

4 - Variation de la quantité de fer fixé en fonction de la température.

Nous avons mené concurremment deux séries d'essais, les uns placés à la température du laboratoire, les autres placés à l'étuve à 37°. Tout le matériel ainsi que les réactifs étaient préalablement placés dans l'étuve afin que l'essai soit d'emblée réalisé à 37°. Les quantités de fer utilisées varient de 52 à 412 μg .

Fer offert en μg	52	104	156	208	310	412
Fer fixé par 1 ml d'hématies à 20°	12	54	144	196	190	220
Fer fixé par 1 ml d'hématies à 37°	18	38	90	172	272	306

La diversité des résultats ne nous permet pas de dire que l'élévation de température augmente la fixation du fer, comme l'avait noté TAVERNIER pour le cuivre (147).

En ce qui concerne d'ailleurs le fer, il n'y a pas intérêt à opérer une fixation à 37° plutôt qu'à la température ordi-

naire car le séjour à 37° fragilise les hématies déjà traumatisées par les lavages subis au cours de la préparation de leur suspension et facilite l'hémolyse.

5 - Variation de la quantité de fer fixé en fonction de l'agitation.

Nous avons essayé d'augmenter et surtout de régulariser la fixation du fer en soumettant nos essais à une agitation mécanique qui, d'une part, maintient un contact permanent de toutes les hématies avec le fer et d'autre part empêche l'agglutination. J. TAVERNIER avait obtenu de cette manière une fixation de cuivre plus importante qu'au repos.

Mais malgré les précautions observées dans l'agitation la fixation de Fe^{+++} altère les hématies au point qu'il y a toujours eu hémolyse dans nos essais. L'agitation est donc inutilisable dans nos essais.

6 - Variation de la quantité de fer fixé en fonction du nombre des hématies.

Nous avons réalisé de très nombreuses expériences parce que l'affinité de lots différents d'hématies varie et nous avons essayé de saisir le plus près possible l'allure du phénomène.

a) Résultats de 6 séries d'expériences (tableau page 37)

Il apparaît que la quantité de fer fixé augmente régulièrement avec le nombre des hématies utilisées jusqu'à un maximum puis décroît.

Le point de fixation maximum varie avec les différents lots d'hématies, mais le phénomène se reproduit toujours. Pour mieux le faire apparaître, nous avons mis sous forme graphique une des expériences précédentes prise comme exemple (essais n° 1 et n° 2 de l'expérience 6) (page 38).

b) Essais d'interprétation

Pour interpréter la courbe de fixation du fer, il est intéressant d'étudier l'agglutination macroscopique. Voici une expérience (réalisée suivant le protocole décrit) dans laquelle nous offrons une même quantité de fer, 200 μg à un nombre croissant d'hématies dispersées dans un volume liquide constant de 20 ml.

FER+++ FIXE EN FONCTION DU NOMBRE DES HEMATIES

<u>FER OFFERT 112 ug.</u>										
1	Volume des									
	hématies en ml	0,40	0,10	0,20	0,50	1				
	Fer fixé en ug	66,4	76	94	71,2	54,4				
2	Volume des									
	hématies en ml	0,04	0,10	0,15	0,20	0,40	0,50	0,75		
	Fer fixé en ug									
	Essai n°1	48,4	77,2	83,2	90,4	89,2	66,4	48,4		
	Essai n°2	47,2	76	89,2	85,6	90,4	70	49,6		
3	Volume des									
	hématies en ml	0,04	0,10	0,15	0,20	0,40	0,50	0,75	1	1,5
	Fer fixé en ug									
	Essai n°1	35,2	46	54,4	54,4	78,4	53,2	37,6	34	31,6
	Essai n°2	30,4	47,2	46	55,6	80,8	48,4	41,8	29,2	23,2
<u>FER OFFERT 224 ug.</u>										
4	Volume des									
	hématies en ml	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24	0,28	0,32	0,5 0,63 0,8
	Fer fixé en ug	54	104	155	157	179	178	189	190	200 199 185
5	Volume des									
	hématies en ml	0,04	0,10	0,20	0,50	1				
	Fer fixé en ug	130,4	155	176,5	186,6	152				
6	Volume des									
	hématies en ml	0,04	0,10	0,15	0,20	0,40	0,50	0,75	1	1,5
	Fer fixé en ug									
	Essai n°1	52,6	69,2	66,8	96,8	110	120	146	141	128
	Essai n°2	52,6	58,4	68	68	116	120,6	140	152	131,6

Quantité de fer fixé en fonction de la quantité d'hématies

Fer fixé en μg

200

100

Volume des Hématies en ml

0,50

1

1,50



Volume des hématies en ml	0,05	0,10	0,25	,50	0,75	1	1,50	2	2,50	3	4
Agglutination	o	o	o	+	++	++	+	+		o	o
(o = nulle + = lente ++ = immédiate)											

Il est remarquable qu'il n'y ait pas d'agglutination aussi bien en présence de faibles quantités d'hématies que de très fortes.

Ce phénomène macroscopique est absolument parallèle à celui de la fixation du fer que nous avons représentée graphiquement.

Nous retrouvons bien là les caractéristiques du phénomène de floculation : progressivité et périodicité.

Le phénomène est absolument semblable à celui qu'on a depuis longtemps mis en évidence dans l'action des sels métalliques sur les protéines. HEUBNER (73) rapporte des expériences où la précipitation des protéines sériques avait lieu pour 0,03 milliéquivalents de métal (Cu-Zn-Pb-Al) par ml de sérum. Cette milliéquivalence est celle qu'il faut utiliser pour obtenir le maximum de précipitation par des acides. La précipitation correspond dans les deux cas à l'état des protéines amenées à leur point iso-électriques. Lorsqu'on augmente la concentration de certains sels métalliques, une deuxième phase apparaît; il n'y a plus de précipitation. Puis une troisième phase succède il y a de nouveau précipitation.

Ces trois phases ont été mises en évidence en particulier pour le fer à l'état de FeCl_3 . Dans une solution à 1p. 100 d'albumine d'oeuf, sans électrolytes, la seconde précipitation a lieu pour une concentration 0,013 M en FeCl_3 .

L'agglutination des hématies par des métaux n'est donc que la traduction particulière d'un phénomène général, la fixation des métaux sur les protéines.

Il nous a semblé intéressant de vérifier que ce phénomène périodique de fixation pourrait se retrouver avec d'autres substrats biologiques.

De dimensions comparables à celles de l'hématie, une levure, la levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) nous a paru convenir pour cet essai.

Nous opérons comme avec les hématies. Dans une première série d'expériences, nous faisons varier la quantité de fer en présence d'une quantité fixe de levure, dans une deuxième série,

nous augmentons régulièrement le volume de levure en face d'une dose fixe de fer. Les résultats sont consignés dans les deux tableaux suivants :

Fer offert en μg	106	148	212	265	378	424
Fer fixé en (Essai n° 1	57,5	84,3	132	145	174,3	211,3
μg par 1 ml (- n° 2	57,5	89,3	123,3	142,5	181,8	230
de levure						

Volume de levures en ml	0,10	0,25	0,50	1	2	3
Fer fixé sur (Essai n°1	30	32	59	54	56	42
100 μg offert - n°2	28	42	58	62	52	32
- n°3	40	44	58	56	28	27
- n°4	30	53	54	56	30	36

Nous constatons, comme pour les hématies, que d'une part la quantité de fer fixée augmente en fonction du volume mis en expérience jusqu'à un certain volume puis diminue.

Le graphique ci-dessous représente bien le même phénomène qu'avec les hématies. (page 41)

Comme les hématies et les protéines, les levures présentent un phénomène de floculation progressif et périodique.

7 - Variation de la quantité de fer et du cuivre fixée en fonction de la tonicité du milieu.

Nous avons mentionné que l'hypertoncité avait empêché l'agglutination des globules rouges par le sulfate de cadmium.

Nous avons pensé que dans un milieu hypertonique, l'agglutination par un cation étant empêchée ou retardée, la surface totale des hématies ne risque pas d'être diminuée et doit de ce fait rendre possible une fixation plus abondante du métal.

Nos expériences ont porté sur le fer et le cuivre on constate d'abord qu'une dose agglutinante de fer (ou de cuivre) ne produit plus d'agglutination en milieu très hypertonique et que la vitesse de sédimentation des globules est d'autant plus ralentie que l'hypertoncité est plus élevée. Le ralentissement de la vitesse de sédimentation peut donc être attribué à la fois à l'augmentation de densité du milieu et à l'absence d'agglutination macroscopique.

Nous avons donc évalué la fixation du cuivre et du fer en présence de diverses concentrations en chlorure de sodium : 8,5 g (isotonique) 17 g (hypertoncité 2 fois) 51 g (hypertoncité 6 fois) et 85 g (hypertoncité 10 fois). Le dosage du cuivre a été suivant la technique indiquée page 44

Quantité de fer fixé en fonction de la quantité de levure

Fer fixé en μg

100

50

Volume des levures en ml

1

2

3

Voici nos résultats :

a) Fixation du cuivre

	Concentration en Cl Na			
	isotonique (Is)	Hypertonique		
		Is x 2	Is x 6	Is x 10
Cuivre fixé en ug sur 100 ug				
Contact (Essai n° 1	47,2	56,8	66,4	90,4
10 min. (Essai n° 2	48	53,6	78,4	
Contact 1 heure (Essai n° 3	66,4	71,2	81	86,4

b) Fixation du fer

	Concentrations en Cl Na					
	isotonique Is	Isx2	Hypertonique			
			Isx4	Isx6	Isx8	Isx10
Fer fixé en ug sur 112 ug	74	94,3		112		112
Fer fixé en ug sur 224 ug	173	192	208	218	218	218

Plus forte que celle du cuivre, la fixation du fer se traduit même par une saturation, les érythrocytes captent tout le fer placé dans le milieu hypertonique où ils baignent.

Comme nous l'avions supposé l'hypertonie empêche la formation d'aggrégats permet à la masse des hématies de garder toute sa surface.

G - RECHERCHE D'UNE COMPETITION ENTRE METAUX DANS
LEUR FIXATION SUR LES HEMATIES

Notre hypothèse de travail était la suivante : si des métaux sont liés à des récepteurs cellulaires identiques, la quantité fixée de chacun doit être modifiée par la présence d'un autre métal.

Les seules indications, que nous possédions à l'époque où nous faisons ces expériences, concernaient une concurrence d'affinité vis à vis des protéines sériques et de coupes de tissu.

KLOTZ et coll. (87) indiquent que le cuivre fixé sur la sérum albumine est totalement déplacé par une quantité égale de mercure et partiellement par des quantités plus importantes de plomb, cadmium, zinc. L'ordre d'activité étant $\text{Hg} \rangle \text{Pb} \rangle \text{Cd} \rangle \text{Zn}$.

SALTMAN et coll. (136) notent que la fixation du fer par des coupes de foie est inhibée par le cuivre et le manganèse mais non par Pb-Co-Zn-Ni-Mo-Mg-Ca.

Ultérieurement d'autres travaux ont paru. CLARKSON et KENCH (33) montrent que la fixation du chlorure de plomb par les hématies n'est pas inhibée par la présence de Cu, Hg^{++} , UO_2 , Zn, Al, même en concentration très supérieure à celle du plomb. Il faut dire que le plomb se lie de préférence aux groupements carbonyle. Et on constate que dans une solution d'albumine, le zinc et le plomb se fixaient indépendamment l'un de l'autre.

SIVARAMA-SASTRY et coll. (140) constatent qu'in vitro la fixation de Zn sur des hématies de cheval est inhibée par FeCl_3 et à moindre degré par CuSO_4 . La fixation du zinc sur un hémoly-sat, n'est inhibée que par le fer. D'autre part, ces mêmes auteurs citent une expérience de HOLMBERG et LAURELL où le zinc est déplacé de sa liaison avec l'albumine par le fer (140). Enfin ils ne manquent pas de rapprocher de ces observations le fait inverse : on a observé l'inhibition des enzymes contenant du fer (cytochrome oxydase et catalase) dans l'intoxication par le zinc.

Au contraire, les sels métalliques suivants :



ne gênent pas la fixation du zinc. Cependant le cobalt forme des complexes avec l'histidine (qui jouerait un rôle dans la fixation sur la membrane des hématies) et le cadmium est connu pour mieux se lier aux protéines que le zinc et que tous deux sont présumés se lier aux mêmes lieux (imidazols).

Mais nous rappellerons que nous avons constaté (page 21) l'inactivité du cobalt et du manganèse (*) et le peu de réactivité du cadmium sur les Hématies, ce qui expliquerait leur défaut à concurrencer le zinc. Au contraire, nos résultats dans les expériences d'agglutination des hématies rapprochaient Fe^{+++} , Cu^{++} , Zn.

Nous avons donc mené une série d'expériences portant sur la recherche d'une concurrence éventuelle entre Fe et Cu d'une part, Zn et Cu d'autre part.

Dosage du cuivre

Nous rappellerons brièvement la méthode de dosage du cuivre au diéthylldithiocarbamate, telle que l'a utilisée TAVERNIER (147).

1- Réactifs

Eau distillée dans un appareil en Pyrex

Acide sulfurique : Merck d = 1,84

Acide nitrique : Merck d = 1,38

Phénolphtaléine en solution à 2 % dans l'alcool à 90°

Ammoniaque R.P. ou Merck d = 0,925 diluée au 1/3 dans l'eau distillée

Solution saturée de citrate d'ammonium R.P. dans l'eau distillée

Solution saturée de pyrophosphate de sodium R.P. dans l'eau distillée

Solution à un pour mille de diéthylldithiocarbamate de sodium. Cette solution doit être absolument incolore : une teinte jaune indique la présence de cuivre (qu'il est facile d'éliminer par extraction du réactif au tétrachlorure de carbone).

Tétrachlorure de carbone Prolabo R.P.

2- Technique de dosage

Les prises d'essai sont alcalinisées par l'ammoniaque à un tiers jusqu'à virage franc de la phénolphtaléine.

On ajoute ensuite en agitant après chaque addition :

- 0,5 ml de la solution saturée de citrate d'ammonium

(*) Sur Staphylococcus aureus, on a mis en évidence une fixation de Fe, Mn, Co. Le fer et le manganèse se lient à 2 types de récepteurs et sont interchangeables sur l'un d'eux ; le cobalt se lie à un seul récepteur et peut s'y échanger avec le fer (129).

- 0,5 ml de la solution saturée de pyrophosphate de sodium
Ramener si nécessaire au virage rouge de la phénolphthaléine par quelques gouttes d'ammoniaque au tiers.

- 0,5 ml de la solution de diéthylldithiocarbamate de sodium à 1 p. 1000. Bien mélanger et agiter.

Il se développe une coloration jaune partiellement masquée par la teinte rouge de la phénolphthaléine.

Ajouter 3 ml de tétrachlorure de carbone exactement mesurés, boucher et agiter chaque tube énergiquement. La dissolution du diéthylldithiocarbamate de cuivre dans le tétrachlorure est rapide et une agitation de une à deux minutes est largement suffisante pour extraire la totalité du complexe coloré.

Abandonner les tubes au repos pendant quelques instants. Par suite de la densité élevée du tétrachlorure la séparation de deux phases est très nette.

Prélever la couche sous-jacente colorée en jaune et la filtrer sur papier dans un tube à essais propre et sec. Cette opération est indispensable pour retenir les traces d'eau qui troublent le tétrachlorure.

Les colorations sont lues au photolorimètre à 440 mμ.

1 - Recherche d'une compétition entre le fer et le cuivre

a) Hématies mises au contact simultané du fer et du cuivre

Dans une première série d'expériences nous avons mis des hématies (1 ml) au contact d'une solution contenant du fer en quantité fixe (100 μg) et du cuivre en quantité variable (100-250 500 μg). Le volume de suspension étant 20 ml, nous avons calculé la quantité de fer fixée dans ces conditions.

Résultats : Fer fixé

Cuivre en μg	0	100	250	500
Fer en μg	100	100	100	100
Fer fixé en μg	78	80	75	72

Les chiffres obtenus montrent que la fixation du fer n'a pas été modifiée par la présence du cuivre.

Dans une seconde série, nous avons mis les hématies en présence simultanément de fer en quantité variable (112 - 224 336 μg) et de cuivre en quantité fixe (200 μg).

Nous avons calculé les quantités de fer et la quantité de cuivre fixées dans ces conditions.

Résultats : Fer fixé

Cuivre en μg	0	0	0	200	200	200
Fer offert en μg	112	224	336	112	224	336
Fer fixé en μg	91	161	209	100	189	234

La fixation du fer n'a pas été gênée. Au contraire nous constatons une légère augmentation.

Nous avons cherché si la fixation du cuivre était elle-même modifiée.

Résultats : cuivre fixé

Fer offert en μg	0	112	224
Cuivre offert en μg	200	200	200
Cuivre fixé en μg	80	104	100

b) Hématies mises au contact du cuivre avant l'addition de fer ou au contact du fer avant l'addition de cuivre.

Dans une première expérience les hématies (1 ml) sont mises dans le volume total de 20 ml au contact de quantités croissantes de cuivre, puis on ajoute une même quantité de fer dans tous les essais (100 μg).

Résultats : Fer fixé

Cuivre en μg	0	75	100	250	500
Fer en μg	100	100	100	100	100
Fer fixé en μg	88	72	48	40	52

Cuivre en μg	0	75	100	250	500
Fer en μg	200	200	200	200	200
Fer fixé en μg	198	136	94	40	52

Cette diminution de fixation du fer qu'on pourrait au premier abord considérer comme due à l'occupation des sites d'attraction de la membrane corpusculaire par le cuivre est peut être due à l'agglutination importante provoquée par le cuivre employé en forte concentration, cette agglutination risquant de restreindre considérablement la surface disponible.

Nous avons donc repris les expériences en utilisant des quantités de cuivre moins agglutinantes.

c) Hématies mises au contact simultané ou successif du fer et du cuivre.

Dans une nouvelle série d'expériences, nous avons mis en jeu 112 μg de fer et 100 μg de cuivre et nous avons procédé de la façon suivante :

- 1 - Fe et Cu sont mis simultanément en présence de 1 ml d'hématies pendant 10 minutes.
- 2 - Cu mis en présence des hématies pendant 10 minutes
Addition Fe. Nouveau contact de 10 minutes.
(Fe a donc été en présence des hématies pendant 10 minutes).
- 3 - Fe mis en présence des hématies pendant 10 minutes
Addition de Cu. Nouveau contact 10 minutes
(Fe a donc été en présence des hématies pendant 20 minutes).
- 4 - Fe seul en présence des hématies pendant 10 minutes
Fe seul en présence des hématies pendant 20 minutes
(Ce sont les témoins de fixation du fer en absence du cuivre).

Résultats : Fer fixé.

	1° Fe + Cu	2° Cu puis Fe	3° Fe puis Cu	4° Fe	
Temps de fixation en minutes	20	10 puis 10	10 puis 10	10	20
Fe fixé (Essai n°1)	81	84	90	71,5	71,5
en μg (- n°2)	83,5		85	79	80,5
sur 112 μg					

Ces résultats montrent que la quantité du fer fixée par les hématies est, ici encore, plutôt augmentée par la présence de cuivre. De plus, il n'y a pas de notable différence entre les résultats suivant que le cuivre et le fer ont été mis simultanément au contact des hématies ou l'un après l'autre.

Nous avons mené une autre série d'expériences en milieu hypertonique.

Nous avons vu que le milieu hypertonique favorisait la fixation du fer et du cuivre sur les hématies et nous avons attribué ce fait en partie à la séduction de taille des agglutinats ou même à leur absence.

Il nous a paru intéressant dans ces conditions de reprendre les essais de compétition du fer et du cuivre, en absence d'agglutination macroscopique dans un milieu où la fixation semble plus aisée, "nous avons choisi la concentration de Cl Na isotonique x 8".

Nous avons, comme dans nos précédents essais de compétition mis en contact les hématies avec chacun des métaux, Fe (112 ug) et Cu (100 ug), ensemble (1°) successivement (2°) (3°) et isolément (pendant 10 minutes et 20 minutes) (4°).

Résultats : Cuivre fixé

	1° Fe + Cu	2° Cu puis Fe	3° Fe puis Cu	4° Cu
Temps de fixation en minutes	20	10 puis 10	10 puis 10	10 20
Cu fixé (Essai 1	68,1	72,5	68,1	38,4 38,4
en ug (- 2	73,6	77,1	64,8	43,7 53,8
sur 100 µg				

La présence du fer favorise nettement la fixation du cuivre ; il semble de plus (comme dans l'expérience en milieu isotonique concernant la fixation du fer page 47) que ce soit l'addition ultérieure du second métal qui augmente le plus la fixation sur l'hématie.

En résumé, l'ensemble des résultats obtenus sur la fixation du cuivre et du fer sur les hématies lorsqu'ils sont en présence l'un de l'autre, n'est pas en faveur d'une compétition réciproque dans nos conditions expérimentales.

2 - Recherche d'une compétition entre le cuivre et le zinc

Dans une première expérience, nous avons mis ensemble CuSO_4 et ZnCl_2 au contact des hématies, dans une seconde expérience, nous avons mis le zinc 10 minutes avant le cuivre, comme dans nos essais avec le fer.

Nos résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Cuivre fixé par les hématies en présence de zinc
(Voir tableau à la page suivante)

Cu en μg	100	100	100	100
Zn en μg	0	2600	5200	7800
Cu fixé :				
(Cu + Zn mis ensemble)	51	61,6	54	48,2
(Zn mis avant Cu)	47,2	48,2	42	37,2

Tandis que la présence du zinc ne paraît pas changer la quantité de cuivre fixé quand il est mis en même temps que le cuivre, son contact préalable avec les hématies a diminué d'autant plus la fixation de cuivre qu'il se trouve en quantité plus importante.

Cependant, l'agglutination nette provoquée par le zinc est une cause d'erreur d'interprétation parce qu'elle réduit la surface cellulaire.

Comme dans nos expériences avec le fer, nous avons renouvelé notre essai en utilisant le zinc à une concentration ne provoquant pas d'agglutination dans le temps de l'expérience. Dans ces conditions, la quantité de cuivre fixé est la même que le zinc soit ajouté en même temps que le cuivre ou avant.

En résumé, notre expérience n'est pas en faveur d'une compétition de zinc et de cuivre dans leur fixation sur l'hématie.

H - DISSIMULATION DU FER PAR LES ACIDES AMINES ET PAR EDTA

A l'exemple de J. TAVERNIER, il nous était facile d'utiliser les effets du fer sur les hématies comme test de présence du métal disponible dans le milieu de suspension de ces hématies. L'addition d'une substance accaparant le fer sous une forme complexe où il est dissimulé, donc inactif, se traduit par une absence ou une diminution des effets observés sur les globules rouges.

Nous nous sommes limité à la dissimulation du fer par quelques acides aminés et par EDTA.

1 - Dissimulation du fer par les acides aminés

Après avoir déterminé la dose minima de fer provoquant l'agglutination d'un lot donné d'hématies, nous avons ajouté à cette dose de fer des quantités croissantes d'acides aminés.

Se sont montrés sans effet protecteur même dans la proportion de 10 molécules d'acide-amino pour un atome de fer :

- l'alanine, le glycocolle, la proline, le tryptophane, la méthionine.

Au contraire, la cystéine, le glutathion empêchent l'agglutination par le fer. Nous avons calculé indirectement la composition du complexe cystéine-fer, en ajoutant à une quantité de fer double de celle nécessaire à l'agglutination totale et immédiate d'un lot d'hématies des quantités croissantes de cystéine (sous forme de chlorhydrate). On constate que la quantité de cystéine la plus élevée permettant encore l'agglutination se trouve, relativement au fer disparu, dans le rapport :

1 molécule CYSTEINE/1 atome FER, en se basant sur le fait qu'il y a agglutination tant qu'il en reste au moins la moitié du fer mis en expérience.

D'après CHABEREK et MARTELL, deux complexes de la cystéine peuvent se former avec le fer : $\text{Fe}^{++}(\text{cystéine})$ ou $\text{Fe}^{+++}(\text{cystéine})_3$. Dans notre cas, il s'agirait donc de la première forme. (31)

2 - Dissimulation du fer par EDTA

L'acide éthylène diamine tétracétique complexe le fer et empêche aussi l'agglutination des hématies par ce métal.

Tandis qu'il est possible de doser le cuivre par la méthode au diéthylldithiocarbamate lorsqu'il est complexé à EDTA, nous nous sommes aperçu, après d'autres auteurs, que Fe^{+++} complexé à EDTA n'était pas dosable à l'o-phénanthroline. Il s'agit d'ailleurs du plus stable des complexes métalliques de EDTA.

Nous avons voulu étudier la stabilité du fer fixé sur les hématies par des lavages à EDTA. Nous y avons renoncé d'abord parce que les hématies, que le contact du fer a fragilisées, supportent difficilement les lavages et s'hémo lysent rapidement et ensuite parce que le dosage à l'o-phénanthroline n'était pas possible.

Il existe deux méthodes de dosage du fer dans le complexe (Fe^{+++} -EDTA) l'une directe, l'autre après addition d'eau oxygénée:

a) Dosage direct colorimétrique du complexe Fe^{+++} EDTA

Le complexe Fe^{+++} EDTA de coloration jaune peut se prêter à une détermination photométrique où la loi de Beer-Lambert est respectée pour des concentrations de 4 à 500 ug de fer par millilitre (159).

b) Dosage colorimétrique du complexe $\text{Fe}^{++}\text{EDTA}$
après addition d'eau oxygénée

Si on ajoute à une solution de complexe ($\text{Fe}^{++}\text{EDTA}$) un excès d'eau oxygénée et si la solution est rendue ammoniacale, il se développe une coloration rouge violette qui peut servir à un dosage (1) (8).

Cette méthode convient en particulier en présence d'autres métaux masqués également par EDTA, le cuivre et le nickel, la seule condition est de lire la coloration à une longueur d'onde où les complexes de cuivre et de nickel sont peu absorbants (5).

Nous avons essayé la technique de RINGBOM et coll. (5): la solution de complexe ($\text{Fe}^{++}\text{EDTA}$) est diluée à 10 ml environ. On neutralise par de l'ammoniaque, on ajoute 2ml d'eau oxygénée à 30 % puis de l'ammoniaque en quantité suffisante pour obtenir un pH égal à 10,5-11, après dilution à 25 ml, on lit à 450 mu.

La première difficulté que nous ayons rencontrée est la décomposition de l'eau oxygénée par simple agitation et le virage rapide de la teinte violette au brun. En réduisant la quantité d'ammoniaque à 1 ou 2 gouttes (pH= 9,5 environ) la coloration devient cependant plus stable.

La seconde difficulté est la lecture. En effet, le seul fait de transvaser le liquide coloré dans la cuve du photomètre provoque un dégagement de bulles rendant illusoire tout dosage. Même en réduisant la quantité d'ammoniaque, comme nous venons de le dire, des bulles très peites se dégagent encore.

Le seul moyen de remédier à cet inconvénient est de développer la réaction colorée dans la cuve elle-même. En fait, nous avons utilisé le photolorimètre Coleman Junior où la lecture se fait dans des tubes et non dans des cuves.

Nous avons adopté le mode opératoire suivant :

Mélanger dans un tube par plusieurs retournements, sans agiter :

Solution de complexe	n	ml
H_2O q. s. p.	9	ml
H_2O_2 à 30 %	1	ml
NH_4OH	1	gtte

La solution de complexe est préparée en ajoutant à une solution d'alun de fer (Fe^{+++}) un excès d'EDTA. A partir de cette solution, nous avons préparé une gamme contenant des quantités croissantes de complexe correspondant à une teneur en fer allant de 22,4 μg à 660 μg .

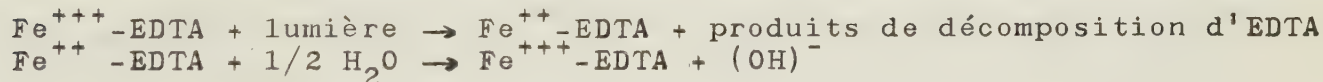
La coloration obtenue montre une bonne proportionnalité avec la concentration en fer. Dans nos conditions d'expérience à $\lambda = 520 \text{ m}\mu$, les densités optiques vont de 3,5 à 52,5. La réaction n'est donc pas très sensible.

c) Dosage colorimétrique du fer dans le complexe ($\text{Fe}^{++}\text{EDTA}$) par l'o-phénanthroline

Le fer du complexe ($\text{Fe}^{++}\text{EDTA}$) n'est pas décelable comme nous l'avons dit, par l'o-phénanthroline, WEIL et METAIS (157) ont d'ailleurs attiré l'attention sur l'erreur commise dans les dosages du fer sérique et du fer urinaire lorsque le malade a été traité par EDTA calcique.

Nous en serions restés là si, un jour, par distraction, nous n'avions ajouté à des solutions du complexe ($\text{Fe}^{++}\text{EDTA}$) tous les réactifs nécessaires au développement de la coloration par l'o-phénanthroline. Nous avons eu la surprise de voir la réaction se développer.

Nous trouvons l'explication de cette anomalie dans une publication de JONES et LONG (82) : le complexe ($\text{Fe}^{++}\text{EDTA}$) est photosensible. Cette propriété a été confirmée (7) (89). Le schéma de décomposition proposé serait :



Photoréduction et réoxydations successives libèrent suffisamment d'ions hydroxyle pour former le composé $\text{Fe}(\text{OH})\text{-EDTA}$ puis finalement un précipité d'hydroxyde ferrique.

Dans notre cas, les solutions examinées avaient été effectivement laissées longtemps au laboratoire et avaient été probablement exposées aux rayons solaires.

Puisque cette photosensibilité du complexe ($\text{Fe}^{++}\text{-EDTA}$) rend possible le dosage du fer, il nous a paru intéressant de rechercher les moyens d'obtenir rapidement cette décomposition du complexe. Evidemment l'ammoniaque le décompose en donnant un précipité d'hydroxyde, mais l'addition d'acide chlorhydrique nécessaire à la technique de dosage par l'o-phénanthroline dissout l'hydroxyde, qui immédiatement se recombine à EDTA. Il faut qu'il y ait non seulement décomposition du complexe mais encore destruction d'EDTA. Cette destruction n'a pu être trouvée par HILL et GOTTINGHAM, mais elle est certaine sinon le fer ne serait pas dosable.

Etude des conditions de destruction du complexe (Fe^{+++} -EDTA)

Voici le détail de cette étude qui a fait l'objet d'une publication (15). Chaque essai a porté sur 1 ml de solution de complexe contenant 11,2 μg de fer. Le dosage du fer est effectué par notre technique habituelle.

Chaque expérience de destruction a été menée, d'une part sur la solution de complexe (Fe^{+++} -EDTA), d'autre part, sur cette solution additionnée de tous les réactifs nécessaires au développement de la coloration avec l'o-phénanthroline (acide chlorhydrique, acide trichloracétique, ammoniacque, sulfate d'hydrazine en solution dans tampon pH 4,6, o-phénanthroline).

Tandis qu'il est nécessaire de développer la réaction colorée dans chaque prélèvement de la solution de complexe (Fe -EDTA) soumise aux essais, dans la solution contenant déjà les réactifs (Fe -EDTA-réactifs) la coloration rose se développe spontanément et permet de saisir aisément le début de la destruction du complexe et sa progression.

Les agents destructeurs essayés ont été : le soleil, l'éclairage artificiel, la chaleur, l'eau oxygénée.

Des échantillons témoins sont conservés, les uns à l'obscurité, les autres à la lumière du jour sans ensoleillement.

- Décomposition spontanée du complexe

1) à l'obscurité - examinées durant 5 jours, les solutions contenant Fe^{+++} -EDTA, l'autre Fe^{+++} -EDTA + réactifs sont restées longtemps stables, Après 24 jours, 20 % du fer est révélabile.

2) à la lumière du jour, mais à l'abri du soleil, Fe^{+++} -EDTA examiné après 23 jours donne une réaction correspondant à 23 % de fer, tandis que Fe^{+++} -EDTA + Réactifs en laisse apparaître 86 %.

- Effets du soleil

a) dans Fe^{+++} -EDTA 70 % du fer est révélabile après 2 heures, 90 % après 5 heures. Puis le liquide jaunit et laisse déposer la totalité du fer sous forme d'hydroxyde, comme le prouve un dosage ultérieur.

b) dans Fe^{+++} -EDTA + Réactifs une coloration rose apparaît rapidement après 10 minutes, la moitié du fer est révélée. Après 5 heures, le développement de la coloration est total.

- Effet d'un éclairage artificiel

Deux lampes sont utilisées, l'une (lampe I) produit à la distance d'éclairement des tubes en expérience une température de 30° , l'autre plus puissante (lampe II) une température de 40° .

a) Dans les deux cas, la solution Fe-EDTA ne commence à donner une coloration rose avec l'o-phénenthroline qu'après 10 heures d'exposition et elle est extrêmement faible. La prolongation de l'éclairement ne la développe pas d'avantage.

b) la solution $\text{Fe}^{+++}\text{-EDTA}$ + Réactifs subit devant la lampe I un très léger rosissement après 10 heures ; après 21 heures, il y a 23 % de fer révélé. Devant la lampe II, la coloration rose est déjà très nette après 6 heures, et après 10 heures, elle correspond à 50 %. Après 21 heures cette quantité n'a pas varié.

On pouvait se demander quelle était, dans ces expériences pratiquées au soleil et à l'éclairage artificiel, la part de la luminosité et la part de la température. Il ne fait pas de doute que la lumière solaire est responsable de la rapidité de décomposition observée car la température était de 37° c'est à dire voisine des température obtenues sous l'éclairage électrique.

Dans ce dernier cas, la température pouvait jouer un rôle puisque l'effet de la lampe II est plus prononcé que celui de la lampe I. D'où les essais suivants menés à des températures différentes.

- Effet de la chaleur seule

1) Etuve à 37° - Après 21 heures, $\text{Fe}^{+++}\text{-EDTA}$ n'a subi aucune décomposition. $\text{Fe}^{+++}\text{-EDTA}$ + Réactifs a légèrement rosi, la réaction décèle 20 % de fer.

2) Etuve à 60° - Après 16 heures, $\text{Fe}^{+++}\text{-EDTA}$ est partiellement décomposé, 35 % du fer est dosé ; $\text{Fe}^{+++}\text{-EDTA}$ + Réactifs est très coloré. Le fer est révélé en totalité.

3) Bain-marie bouillant - $\text{Fe}^{+++}\text{-EDTA}$ en solution pure ou même acidifiée par HCl + CCl_3 ne subit pas de décomposition par 30 minutes de chauffage au bain-marie bouillant.

Fe-EDTA + Réactifs se colore très rapidement, et après 10 minutes l'intensité de la coloration correspond à la totalité du fer. La teinte obtenue est toutefois d'un rose tirant davantage sur le jaune que la coloration habituelle.

- Effets de l'eau oxygénée

Nous avons alors cherché si un oxydant chimique pouvait être utilisé. Un essai préliminaire nous avait montré que l'addition de quelques gouttes d' H_2O_2 à 100 volumes à la solution Fe^{+++} -EDTA, provoquait à une température ordinaire ou à chaud l'apparition d'une coloration jaune et une précipitation immédiate d'hydroxyde.

Malheureusement lors du développement de la réaction à l'o-phénanthroline, la teinte obtenue est orangée et non rose, ou même vire au jaune, nous avons alors renouvelé l'expérience avec des quantités plus faibles d'eau oxygénée.

Il résulte de ces essais que :

1) - une goutte d'eau oxygénée à 100 volumes est capable d'activer la destruction du complexe Fe^{+++} -EDTA soumis à un éclairage artificiel. Alors que cette destruction en son absence ne va pas au-delà de la mise en évidence de traces de fer comme nous l'avons dit, en présence d'eau oxygénée le fer est totalement libéré après 6 heures.

- une goutte d'eau oxygénée à 100 volumes active également la décomposition de Fe^{+++} -EDTA + Réactifs puisque le léger rosissement observé après 10 heures d'exposition devant la lampe I fait place à une réaction colorée correspondant à la totalité du fer.

Si l'éclairage est poursuivi, la coloration vire au jaune, l'emploi de l'eau oxygénée à 100 volumes est donc délicat.

2) - Il convient d'utiliser de l'eau oxygénée moins concentrée.

L'emploi de 5 gouttes d'eau oxygénée à 30 volumes, ou même à 10 volumes suffisent par un contact d'une nuit avec la solution Fe^{+++} -EDTA à permettre le dosage de tout le fer du complexe.

CONCLUSIONS

Dans la solution du complexe Fe-EDTA les divers moyens physiques de destruction essayés montrent peu efficaces. Au contraire, le complexe additionné de tous les réactifs nécessaires au développement de la réaction avec l'o-phénanthroline (Fe-EDTA + Réactifs) est très sensible.

Parmi ces moyens le chauffage à l'étuve à 60° de Fe-EDTA + Réactifs nous paraît d'un usage facile, de même l'emploi de H_2O_2 à 10 volumes ajoutée à la dose de quelques gouttes.

2ème PARTIE

ACTION DU FER SUR DIVERS TISSUS ET SUR DIVERS PROTEIDES

A - FIXATION DU FER SUR LES TISSUS IN VITRO

Nous avons fait quelques expériences de fixation de Fe^{+++} sur des tissus entiers pour chiffrer l'importance de cette fixation. Nous avons utilisé des organes de Rats et de Cobayes. Voici deux expériences où des fragments d'organes de poids connus sont mis au contact de 20 ml de solution d'alun contenant 500 μg de fer pendant 10 minutes.

	RAT			COBAYE			
Organes	cerveau	foie	intestin	cerveau	foie	intestin	poumon
Poids en g	1,165	2,5	3,375	1	1	1	1
Fe fixé en mg pour 100g de tissu	35	17,7	12,8	45	38	43	36

Dans 5 essais sur 7, la fixation est du même ordre de grandeur quel que soit le tissu mis en oeuvre. La seconde expérience menée sur des échantillons de même poids (1 g) nous paraît plus valable que la première expérience. Elle nous autorise nous semble-t-il, à comparer la fixation du fer à la fixation du cuivre qu'a étudiée TAVERNIER (147). Elle nous paraît beaucoup plus importante car sur les 15 pourcentages de fixation du cuivre indiqués par l'auteur (après plusieurs heures de contact) un seul atteint 37,3 mg, tous les autres se trouvent en dessous de 25 mg.

Nous pensons que ces chiffres élevés sont dus à la précipitation du sel ferrique à l'état d'hydroxyde au contact des tissus, ce qui évidemment fausse l'expérience.

On a en effet déjà étudié la fixation du fer sur les tissus, mais en renonçant à utiliser les ions ferreux ou ferriques libres, justement en raison de la formation rapide d'hydroxyde. C'est ainsi que SALTMAN et coll., emploient le citrate de fer et d'ammonium, c'est-à-dire un fer sous forme complexée. Le fer se lierait in vitro au tissu hépatique en des lieux spécifiques peut être la ferritine, et la membrane cellulaire ne jouerait aucun rôle. A l'intérieur des cellules les acides nucléiques participeraient aussi peut être à la fixation du fer.

En se basant sur le résultat d'analyses de tissus musculaire, HAMM (69) déduit un ordre d'affinité des ions métalliques pour les protéines insolubles et classe le fer avant le zinc, le calcium, le magnésium.

La fixation du fer sur les tissus nous a paru trop compliquée pour poursuivre utilement des recherches sur ce sujet, et nous nous sommes limité à l'expérience rapportée ci-dessus.

B- ACTION DU FER SUR LA CONTRACTILITE DE L'INTESTIN IN VITRO

Nous avons essayé l'action du fer (Fe^{++} sous forme de sel de Mohr, & Fe^{+++} sous forme d'alun) sur l'intestin isolé de Rat et de Cobaye (page 59)

Le fer ne possède pas d'action excitante sur la musculature lisse. L'intestin de Rat qui présente toujours des contractions spontanées permet de mettre en évidence une action inhibitrice de Fe^{++} . A des doses comprises entre 500 et 1000 μg ajoutées à 20 ml du bain où plonge le fragment intestinal, les contractions spontanées disparaissent puis reprennent d'elles-mêmes ou mieux après lavage. Pour des doses supérieures, l'inhibition ne cesse qu'après lavage.

Contrairement au sel ferreux, l'alun ferrique se montre sans action. Ces résultats sont en accord avec ceux de HENDRYCH (in 73).

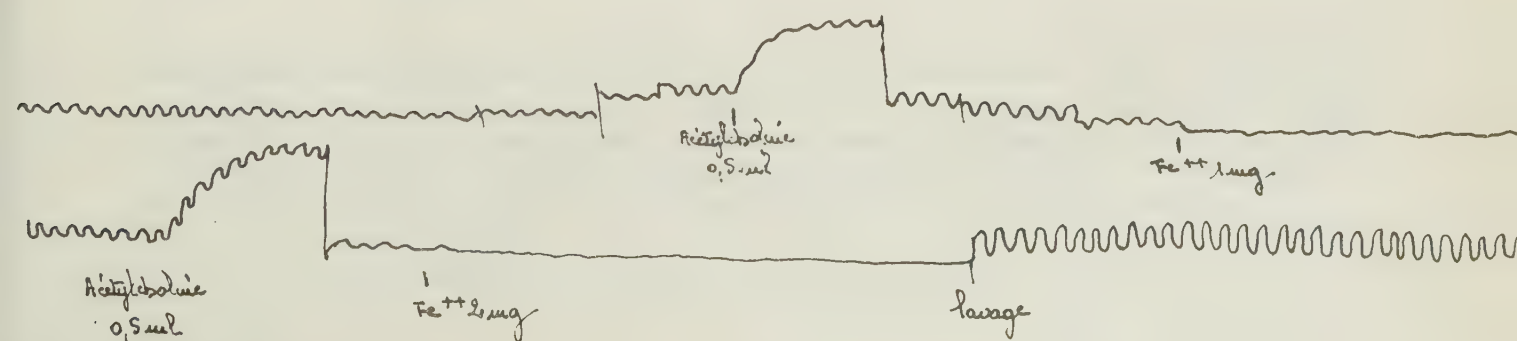
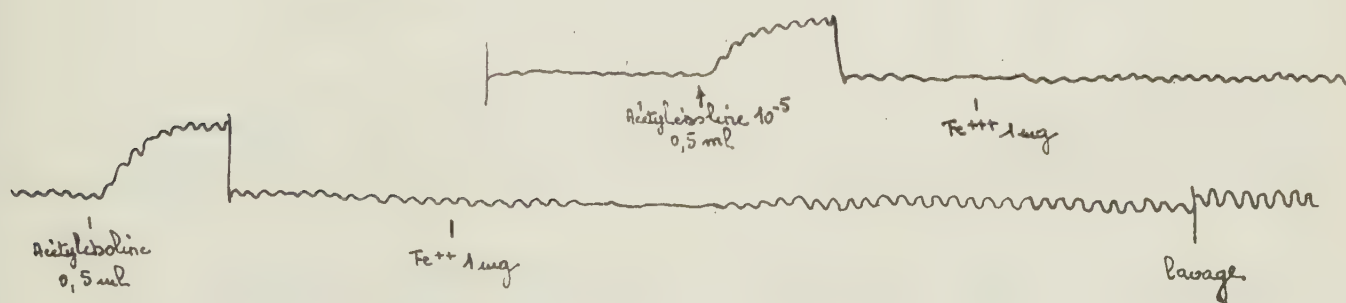
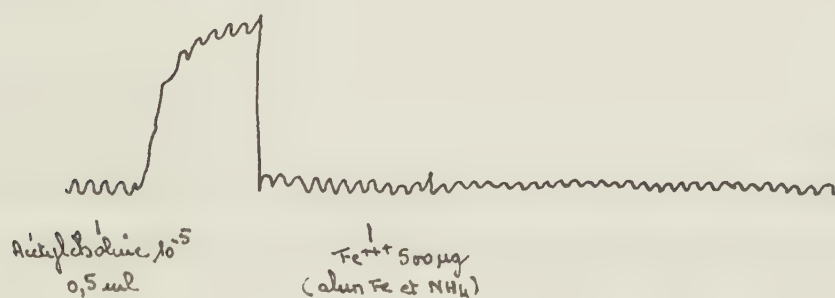
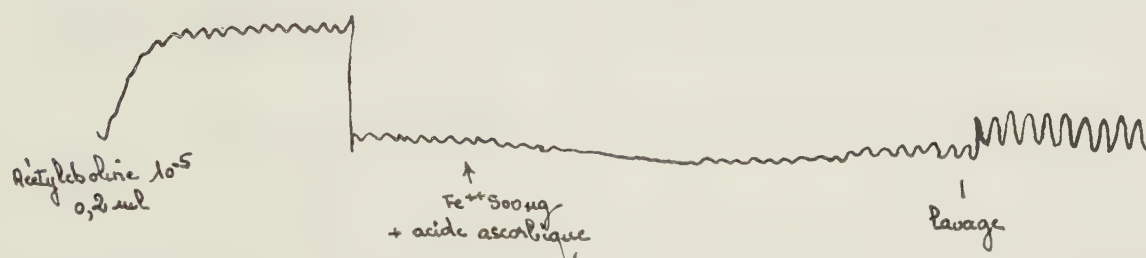
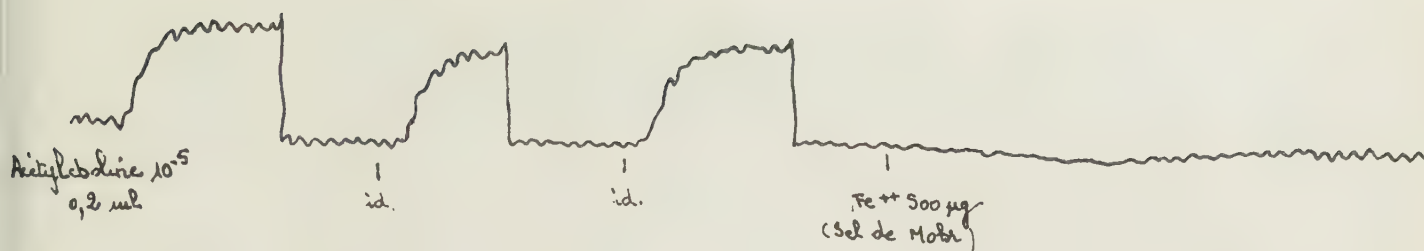
C - COMPORTEMENT DU FER ET DE QUELQUES AUTRES METAUX VIS-A-VIS DE CERTAINES PROTEINES SANGUINES

1 - Action précipitante sur les protéines sériques.

Ayant comparé l'action des métaux sur les hématies, nous nous sommes demandé si l'agglutination connue des protéines sous l'effet de divers ions métalliques présentait quelques analogies avec l'agglutination décrite chez les hématies. La taille des éléments est évidemment fort différente. Nous avons l'avantage de connaître pour les protéines, quoique encore imparfaitement, les modes d'intervention possible des ions.

La sensibilité des protéines sériques vis-à-vis des ions métalliques a été mise largement à profit dans les épreuves dites tests de floculation non spécifiques ("tests hépatiques"). Il y est fait appel à la précipitation par HgCl_2 (TAKATA-ARA) (GROS) ZnSO_4 ou CuSO_4 (KUNKEL) CdSO_4 (WUNDERLY). Suivant KUNKEL, les sels de plomb et d'uranium pourraient également être utilisés.

Si nous comparons l'activité du mercure, du zinc, du cuivre et du cadmium dans ces tests en la ramenant à la quantité de métal nécessaire pour provoquer un début de précipitation dans 0,1 ml de sérum normal, nous trouvons :



- solution M/100 en Hg0,3 ml
- solution M/100 en Cd0,1
- solution M/100 en Zn ou Cu0,06

Soit une activité décroissante

Cu et Zn > Cd > Hg

Nous avons dans nos expériences opéré sur 1 ml de dilution au dixième d'un mélange de sérums normaux. Nous ajoutons la quantité suffisante de chacun des sels métalliques pour obtenir le début de précipitation. Nos résultats sont les suivants.

Volume minimum de solutions métalliques provoquant un début de précipitation :

Ions métalliques	Cu	Zn	Fe ⁺⁺⁺	Au	Hg	Cd	Mn	Co	Ni	Na
concentration	M/1 000				M/100		M/10			
volume versé en ml dans 1 ml de sérum dilué au 1/10	0,5	0,5	0,8	0,3	0,5-1	0,7	à 1 pas de pré- cipitation			

Nous trouvons donc une activité décroissante :

Cu et Zn > Fe > Au > Hg - Cd

Cette séquence diffère de celle que nous venons d'écrire à propos des tests de floculation par l'emplacement du cadmium. Nous lui attribuons ici une activité voisine de celle du mercure.

Nous inscrivons en plus l'action du fer⁺⁺⁺ et de l'or, le premier se rapprochant du cuivre et du zinc, le second du mercure et du cadmium.

Une recherche analogue d'échelle d'activité précipitante des ions métalliques sur les protéines sériques figure dans une publication d'URIEL (152). Cet auteur détermine l'activité précipitante de divers métaux, sous forme d'acétates. Sur les protéines sériques fractionnées sur plaque de gélose, il obtient une intensité de précipitation décroissante dans l'ordre :

Cu > Zn > Cd > Ni > Co > Mn > Ba > Ca

Seuls le zinc et le cuivre donnent une précipitation totale. Le nickel et le cobalt provoquent ici une précipitation partielle. Nous les avons trouvés inactifs dans les limites de concentrations que nous avons utilisées. Ceci peut s'expliquer par les conditions expérimentales différentes : dans l'expérience d'URIEL, la plaque de gélose qui porte les protéines de 0,02 ml de sérum, est plongée 16 heures dans 5 fois son volume de solutions métalliques $M.10^{-2}$, c'est-à-dire que les protéines se trouvent en présence d'une très grande quantité de sels métalliques. La séquence Cu - Zn - Cd est la même.

Si nous nous reportons maintenant à l'agglutination des hématies (page 21) où l'ordre d'activité agglutinante était ;

Cu - Fe - Pb } Zn - Cd

Nous retrouvons en tête le cuivre tandis que le fer et le zinc ont changé leur place. Quant au cadmium, il se montre le moins actif (comme sur les protéines). L'argent et le plomb qui figurent dans les expériences sur les hématies n'ont pu évidemment être utilisés sur le sérum en raison de la présence des chlorures.

En possession de ces résultats, nous nous sommes demandé si on pouvait expliquer l'ordre dans lequel se trouvent placés les ions métalliques lorsqu'on considère leur action agglutinante sur les hématies et sur les protéines.

On sait que la molécule protéique porte des groupements chimiques susceptibles de se combiner aux ions métalliques avec des affinités différentes (groupements - COO^- , -OH, - NH^+ , -SH).

Les affinités des ions métalliques pour le groupement carboxyle des acides aspartique et glutamique, le noyau imidazole de l'histidine, le groupement aminé de la lysine et le groupement sulfhydryle de la cystéine sont résumées dans les séries suivantes (49) (50) (68) (93) (96) (146) :

vis-à-vis de - COO^-	Hg ⁺⁺	>	Cu ⁺⁺	>	Pb	>	Cd	>	Zn	>	Ag
imidazole	Cu ⁺⁺	>	Ni	>	Cd	>	Zn	>	Pb		
- NH^+	Hg ⁺⁺	>	Co	>	Cu	>	Ag	>	Ni	>	Cd
-SH	Hg ⁺⁺	>	Ag	>	Pb	>	Cd	>	Zn	>	Cu
											Zn-Co
											Co > Mn

L'affinité du mercure pour le groupement sulfhydryle est bien connue. Il est capable de donner un dimère avec une portion de la sérum albumine qui contient un SH (et porte de ce fait le nom de mercaptalbumine). L'argent est inhibiteur compétitif de cette réaction. (48)

Comme le mercure se trouve aussi en tête dans l'ordre d'affinité pour les autres groupements que nous avons cités, on conçoit que l'intensité de son action sur les hématies s'explique aisément.

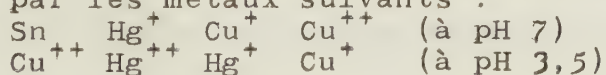
Le cuivre doit peut être sa première place dans les diverses échelles d'action agglutinante au fait qu'il se lie aux principaux sites d'attraction protéique. Il en serait de même pour le zinc.

URIEL pense que la liaison au groupement imidazole est particulièrement importante pour le cuivre. Elle assurerait la fixation du cuivre sur la sérum-albumine, au moins pour les 15 premières places qu'il peut occuper sur la molécule. Tandis qu'à son avis, il n'y aurait pas de liaison avec les groupements carbonyles, sur lesquels ont insisté KLOTZ et ses collaborateurs. Quant à la liaison du cuivre avec les groupements sulfhydriles, elle a été signalée comme se rapprochant de celle du mercure (85) contrairement à l'indication figurant dans la liste donnée ci-dessus.

Le cobalt et le nickel (inactifs dans nos expériences) ne se lient qu'à deux sites d'attraction sur les quatre envisagés ci-dessus.

STAUFF et UHLEIN (142) qui ont étudié l'influence des ions métalliques sur la rapidité de dénaturation par la chaleur des protéines ont aussi cherché à expliquer les ordres d'activité qu'ils obtenaient à pH neutre et à pH acide.

Dans le cas de la sérumalbumine, la dénaturation est accélérée par les métaux suivants :



Le plomb est inactif et le zinc retarde le phénomène dans les deux cas.

Il nous est difficile d'interpréter ces deux échelles d'activité car dans ces expériences les métaux ne sont pas utilisés en quantités équimoléculaires. Il est évident en tous cas que ces séries ne correspondent pas du tout aux activités agglutinantes (le zinc s'oppose ici à la dénaturation protéique). Dans d'autres expériences que rapportent ces auteurs le zinc et le fer⁺⁺⁺ se montrent également inactifs.

L'influence de la liaison sulfhydrile avec les ions métalliques sur la dénaturation thermique des protéines, que STAUFF & UHLEIN avaient prise comme hypothèse de travail, se révèle comme insuffisante et implique l'existence d'autres liaisons.

Nous n'avons pas encore parlé du fer qui ne figure pas dans la liste que nous avons rapportée. Dans un tableau comparatif cité par KLOTZ (85) concernant les modes de liaison aux protéines de Na, Ca, Fe^{+++} , Zn, Cu^{++} , Hg^{++} , le fer est présenté comme ne différant du zinc que par une fixation plus intense sur les fonctions phénol.

Dans l'ordre de stabilité de complexes aminés métalliques, ALBERT (1) met Fe^{+++} à la dernière place, loin du cuivre qui occupe la première place. Il note ailleurs (2) que l'affinité des ions métalliques pour deux antibiotiques, la terramycine et l'auréomycine est la même que pour les acides aminés, avec une exception concernant le fer, aussi bien ferreux que ferrique. Fe^{++} est plus actif qu'on ne s'y attendrait et Fe^{+++} occupe la première place, il est le plus fortement lié. L'ordre de stabilité des complexes métalliques des antibiotiques est :



En examinant l'ordre d'affinité des ions métalliques vis-à-vis de l'arginine, S. PELLETIER place également le fer trivalent à la première place : (116)



Le fer, Fe^{+++} , serait donc susceptible de contracter des liaisons biologiques plus solides que les autres ions considérés en général comme plus actifs.

Les affinités de chélation correspondraient peut être mieux comme terme de comparaison que les liaisons à des groupements particuliers.

Voici une série de tendance décroissante des ions à former des complexes :



On doit constater qu'elle ne permet pas plus que les séries précédentes d'expliquer l'inactivité ou du moins la très faible activité des ions Co et Ni vis-à-vis des protéines ou des hématies. KLOTZ et LOH MING (86) avaient d'ailleurs noté que la liaison de chélation n'est pas forcément la traduction de la liaison aux protéines.

(*) DATTA et coll. (39) ne font pas figurer le fer dans la liste d'affinité pour la leucine.

Si on considère par contre la stabilité des deux complexes naturels la conalbumine et la sidérophiline, suivant le métal qu'elles contiennent, on constate que cette stabilité va en décroissant dans l'ordre :



On sait qu'il ne s'agit pas de liaison avec des groupements SH (la conalbumine n'en renferme pas) mais de liaison avec des groupements phénoliques (page XVII).

Ces 3 ions métalliques se sont justement montrés les plus actifs dans nos expériences sur protéines sériques et sur hématies. Nous pensons donc que cette liaison prend peut être une part importante dans l'agglutination.

En tous cas, il nous est impossible à l'heure actuelle d'indiquer la nature des groupements de la molécule protéique qui entrent plus ou moins en jeu suivant le métal dans la liaison avec les protéines par les ions métalliques (68) : page 65

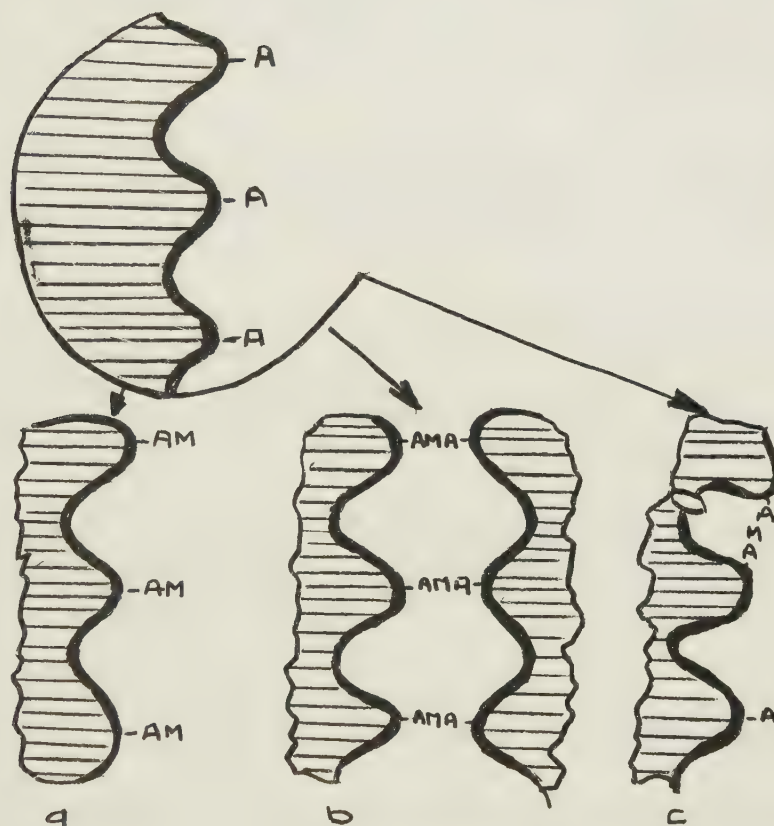
La liaison métal protéine peut être de trois formes :

- a) complexes simples dans lesquels chaque cation M se combine avec un seul groupement réactif A
- b) complexes chélatés dans lesquels le métal se combine à deux groupements appartenant à deux molécules.
- c) complexes chélatés dans lesquels le métal se combine à deux groupements appartenant à la même molécule.

Des données expérimentales citées par les auteurs, il résulte que la forme (a) prédomine par exemple dans les complexes insolubles sérum albumine-zinc et sérum albumine-plomb. Il est probable que cette même forme est fréquente dans les précipités métal protéines et porte la responsabilité du début de l'agrégation protéique. Cette forme (a) peut affecter la solubilité par deux mécanismes, l'ion métallique modifie la charge électrique de la protéine, comme le font les ions H^+ , d'autre part la présence du métal dans la molécule peut affecter la solvation des groupements réactifs. Ce dernier point est peu connu mais intervient certainement beaucoup dans l'agrégation.

La forme (b) est typiquement représentée dans le dimère mercurique de la sérum-albumine.

La forme (c) est celle du complexe chélaté sidérophiline $(\text{Fe}^{+++})_2$.



2 - Apport de l'électrophorèse dans l'étude de la liaison du fer aux protéines sériques.

Il y a quelques années S. BESSON & J. TAVERNIER publiaient des figures d'analyse électrophorétique représentant la précipitation progressive des différentes protéines sériques, sous l'action du cuivre (19) (147). Nous avons cherché si le fer dont l'activité s'est toujours montrée dans les expériences très voisine de celle du cuivre, nous donnerait les mêmes images.

Notre expérimentation a été menée au moyen de l'appareil ELPHOR à électrophorèse sur papier, en utilisant une tension de 110 volts, un tampon véronal-acétate de pH 8,6 et une durée de migration de douze heures.

Afin d'éviter une trop grande dilution des protéines, nous préparons les complexes en ajoutant à 1 ml de sérum des quantités de fer sous un volume de 1 ml. La dilution est au 1/2. Après centrifugation, la liqueur surnageante qui contient les protéines non précipitées est soumise à l'électrophorèse.

Après séchage à l'étuve à 100° des bandes de papier, les différentes fractions protéiques sont révélées à l'amidoschwartz, qui les colore intensément en bleu. Le dépouillement est fait avec un lecteur automatique ZEISS.

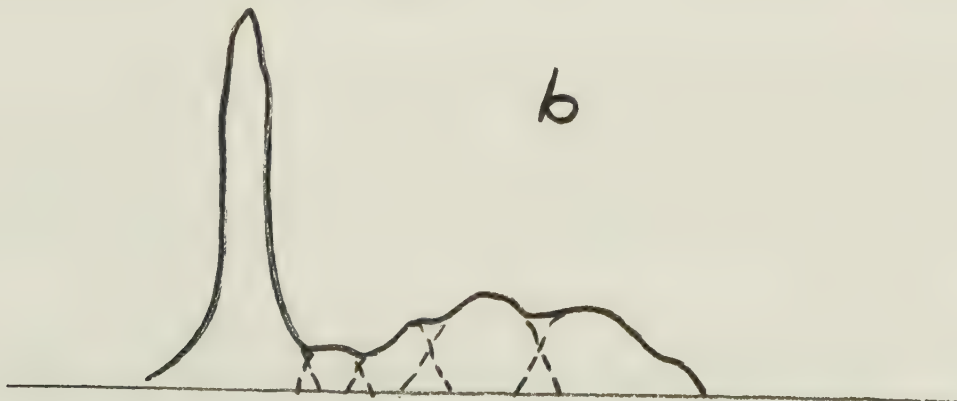
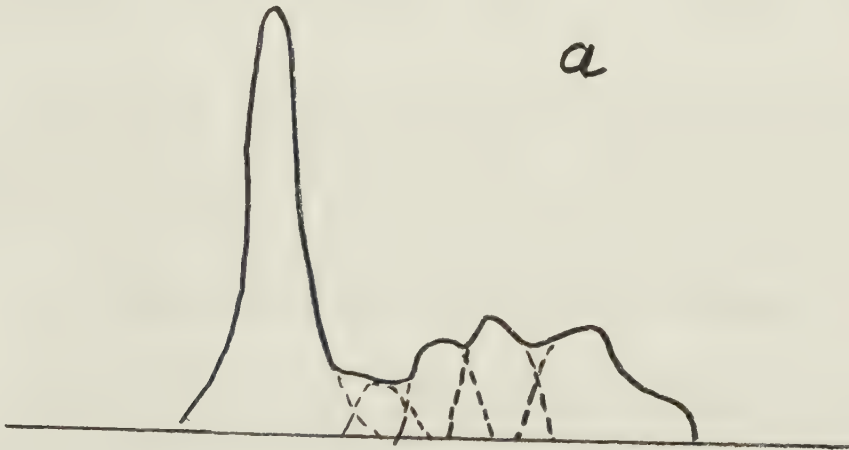
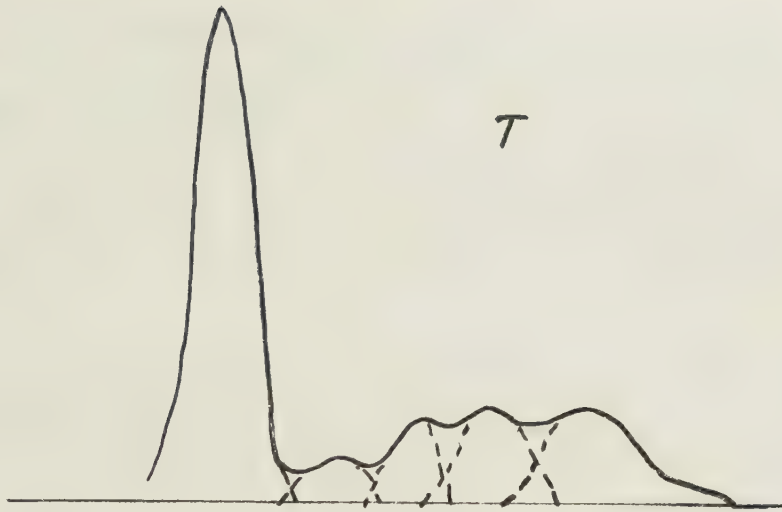
D'autre part, nous avons révélé le fer sur les bandes d'électrophorèse à l'aide de la réaction à l'o-phénanthroline.

A titre d'exemple, nous donnons les protéinogrammes obtenus après addition à 1 ml de mélange de sérums humains normaux, 1 ml de soluté de chlorure de sodium isotonique contenant les quantités suivantes de fer : (page 67)

- 0 mg de fer (courbe T)
- 0,56 mg de fer (courbe a)
- 1,12 mg de fer (courbe b)

l'addition de 0,56 mg de fer ne donne aucune précipitation alors que celle de 1,12 mg donne un abondant précipité.

Après révélation du fer sur les bandes, celui-ci apparaît sur toutes les fractions protéiques, mais avec une intensité toute particulière sur les albumines, qui évidemment, sont les plus abondantes. Ce qui prouve bien qu'avant même d'entraîner une précipitation, le fer se lie à toutes les fractions de protéines.



Ce manque de spécificité est aussi très net sur les protéinogrammes où l'on retrouve après l'action précipitante du fer toutes les fractions protéiques. Dans les expériences de BESSON & TAVERNIER la précipitation des protéines commençait avec l'addition de 0,3 à 0,4 mg de cuivre, alors que pour le fer, la précipitation ne débute qu'avec l'addition d'une quantité supérieure à 0,56 mg. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux qui ont été obtenus précédemment lors des essais sur sérum (page 60).

Postérieurement à nos expériences, URIEL (152) a étudié l'activité précipitante de quelques métaux sur les protéines sériques déjà séparées par électrophorèse en gélose. La conclusion de son travail s'applique fort bien à nos propres essais :

"L'activité précipitante sur les protéines sériques des métaux étudiés semble être non spécifique... Parmi les métaux étudiés, le cuivre est celui qui montre et de loin le plus grand pouvoir précipitant envers les protéines sériques".

Rappelons que la protéine précipitée par un métal peut être récupérée de ses complexes insolubles et retrouver ses qualités en particulier sa solubilité. Ceci est facile à mettre en évidence par exemple en ajoutant une substance complexante telle que EDTA, qui s'empare du métal et libère la protéine.

3 - Fixation du fer sur la sidérophiline

La propriété chimique essentielle de la sidérophiline est son pouvoir de fixation d'ions métalliques. In vivo, la sidérophiline se lie au fer, une autre protéine plasmatique, la céruloplasmine fixe le cuivre. In vitro, la sidérophiline, comme la conalbumine du blanc d'oeuf, fixe deux atomes de fer ou de cuivre par molécule. Le complexe formé est coloré.

Ce coefficient de fixation permet de calculer la teneur du sérum en cette protéine. La fixation du fer a été particulièrement étudiée. Le fer entre en combinaison à l'état trivalent, ce qui n'exclut cependant pas la possibilité d'employer expérimentalement le fer sous forme bivalente pour des essais ou des dosages de capacité de fixation de sérum. (84) (145) (164)

Laissant de côté l'utilité clinique du dosage de la capacité de saturation de la sidérophiline plasmatique (101), nous nous arrêterons sur les techniques parce qu'elles sont basées sur la relativité des forces de liaison du fer pour le substrat biologique et pour les réactifs.

a) Méthodes de dosages classiques (47) (72)- méthode directe

Cette méthode utilise la coloration rose du complexe protéine-fer dont le spectre d'absorption montre un maximum entre 450 et 460 mμ. Il suffit d'ajouter progressivement le sel ferrique ou ferreux au sérum et de suivre au photomètre l'acroissement de l'absorption. Dès que l'absorption devient constante, la protéine est saturée.

- méthodes indirectes

Un excès de sel de fer est ajouté au sérum. On dose soit l'excès de fer après élimination du complexe saturé, soit le fer du complexe après élimination de l'excès de fer.

- méthodes où l'on utilise le fer radioactif (54)

Ces différentes méthodes ne donnent pas toute satisfaction et la concordance entre les résultats fournis laisse à désirer.

b) Essai et mise au point d'une technique avec élimination du fer en excès par un carbonate.

Nous avons pensé faire appel à l'affinité connue des sels de fer (et de cuivre) pour le carbonate de calcium (28) (35) afin d'éliminer le fer en excès ajouté au sérum et ne laisser que le fer combiné à la sidérophiline. Ce qui supposait que la liaison du fer à la sidérophiline était plus puissante que celle du fer au carbonate de calcium.

Au cours des essais, nous avons utilisé comme référence la méthode classique de LAURELL, modifiée par BRENDSTRUPP (25) suivant la technique employée par LANGE (91).

Cette méthode repose sur le principe que le fer libre réagit directement avec l'o-phenanthroline tandis que le fer lié à la sidérophiline ne réagit qu'après une hydrolyse acide et une défécation protéique.

Nous la décrirons rapidement :

Réactifs

1 - $S_2O_4Na_2$ à 167 mg %

- 2 - o-phénanthroline à 2 % dans alcool à 10 %
- 3 - solution standard fer
0,700 g de sel de Mohr
1 ml ClH concentré
H₂O q.s. pour 1000 ml
- 4 - solution d'acide ascorbique à 6 %

Mode opératoire

A 1 ml de sérum sont ajouté 0,075 ml de mélange à parties égales de fer et acide ascorbique (3 et 4). Après 5 minutes, addition de 0,025 ml d'o-phénanthroline à 2 % (2) et 0,9 ml de Na₂S₂O₄ à 167 mg %. Laisser une heure. 1 ml du mélange est placé dans un Erlen de 25 ml ; ajouter goutte à goutte 0,5 ml de ClH à 10 %, agiter fréquemment pendant 10 minutes, Addition de 1 ml de H₃COOH à 20 %, agiter, laisser 10 minutes, centrifuger. 1 ml de surnageant est pipeté dans un tube de 2,5 ml et le dosage se termine comme pour un fer sérique par l'obtention d'un pH correct, l'addition d'un réducteur et d'o-phénanthroline.

- Nous avons d'abord utilisé le carbonate de calcium pro Analyti Merck, (il ne contient pas de fer).

Le premier essai à effectuer est de vérifier la stabilité du complexe sidérophiline-fer en présence de carbonate de calcium. Nous l'avons réalisé sur plusieurs sérums et en particulier celui d'un malade atteint d'hémochromatose dont la sidérophiline était totalement saturée (sérum n° 2).

	Sérums		
	n°1	n°2	n°3
Fer sérique en µg pour 100 ml	110	260	125
Fer sérique après agitation du sérum avec CO ₃ Ca et centrifugation	110	260	129

Ces trois exemples montrent que le carbonate de calcium ne détache pas le fer fixé sur la sidérophiline.

Dans un second groupe d'essais, nous avons cherché si la précipitation des sels de fer par le carbonate de calcium dépendait de la valence.

- Le fer bivalent est précipité partiellement ce qui nous a donné à penser que seul le fer ferrique est entraîné. D'ailleurs si nous stabilisons la solution ferreuse par de l'acide ascorbique, nous ne pouvons pas précipiter la totalité du fer ferreux.

- nous avons vérifié que le fer trivalent peut être précipité totalement dans certaines conditions.

Dans une première expérience, nous ajoutons, à une solution contenant 200 µg de fer dans un volume de 20 ml, des quantités croissantes de carbonate de calcium. Le temps de contact est de 5 minutes. Après centrifugation, nous dosons le fer restant en solution.

Co_3Ca	0	0,020	0,100	0,200
Fer restant en solution en µg	200	18	12	10

Ces résultats montrent que l'élimination du fer n'est pas totale, il est nécessaire d'augmenter la quantité de carbonate de calcium ; d'où l'essai suivant où la quantité de fer elle-même est diminuée :

CO_3Ca	0	0,100	0,500	0,750	1	1	2
Fer restant en solution en µg	100	46	36	28	14	7	0

En conclusion, il est possible d'éliminer la totalité du fer trivalent contenu dans une solution au moyen de carbonate de calcium à condition d'en utiliser une quantité suffisante, mais qui est énorme par rapport à la quantité de fer.

c) Application au sérum sanguin

Nous mélangions dans un tube à centrifuger : 2ml de sérum + 4ml de solution ferrique à 500 µg. p. 100 ml.

Après repos de 5 minutes, nous ajoutons 4g de carbonate calcium. Après agitation et repos de 5 minutes, la suspension était centrifugée et le fer dosé dans le liquide surnageant.

Avec ce mode opératoire, nous avons trouvé par exemple, que 1000 µg de fer se "fixaient" sur 100 ml de sérum alors que la capacité de saturation obtenue par la technique de LANGE donnait un chiffre de 312.

Nous avons répété cet essais à plusieurs reprises et nous nous sommes aperçu que le carbonate de calcium n'entraînait pas de fer dans ces conditions.

Nous pensons que la dilution du fer dans la solution de chlorure de sodium n'étant pas stable, l'hydrate de fer formé donnerait une liaison protéique plus forte que celle qui existe entre le fer et le carbonate de calcium.

C'est alors que nous avons pris connaissance de la publication de RAMSAY (122). Cet auteur propose une méthode de dosage de la sidérophiline, basée sur l'élimination du fer trivalent non lié par du carbonate de calcium ou de magnésium. L'auteur sature le sérum par une solution de chlorure ferrique et opère en milieu acide.

Nous avons en conséquence modifié notre première manière d'opérer et nous avons dilué la solution mère d'alun M/50 dans de l'acide chlorhydrique N/200. De plus, nous avons fait varier le temps de contact du sérum et du carbonate de calcium.

Voici les résultats obtenus sur un sérum contenant 125 μg . de fer et surchargé par 1225 μg de fer.

Temps de contact du sérum avec $\text{CO}_3 \text{ Ca}$ (4 g) en minutes.	5	10	15	30	60
Fer retrouvé en solution (rapporté à 100 ml de sérum).	660 675	660 650	690 665	690 720	660 660

Il est évident que la quantité restante de fer est beaucoup trop basse et correspond à une fixation très importante. Or, la capacité de saturation du sérum normal utilisé était 390. Il est vrai qu'une expérience précédente (page 71) nous a montré qu'un gramme de carbonate de calcium ne réussit à fixer que 93 μg de fer. Ici les 4 grammes n'ont donc pu fixer au maximum d'environ $93 \times 4 = 372 \text{ ug}$. Nous trouvons qu'ils en ont fixé 300. La correspondance est bonne et confirme que la quantité de carbonate de calcium utilisée ne peut fixer tout le fer mis en excès.

RAMSAY bien qu'indiquant l'utilisation du carbonate de calcium aussi bien que celle du carbonate de magnésium pour capter le fer, emploie dans sa méthode le carbonate de magnésium en quantité très faible (100 mg). Nous avons donc repris nos essais en substituant le carbonate de magnésium au carbonate de calcium ($\text{CO}_3 \text{ Mg}$ Prolabo RP pour analyses).

- Utilisation du carbonate de magnésium. Nous avons vérifié la stabilité du complexe fer-sidérophiline; en présence de carbonate de magnésium, en dosant le fer de quelques sérums avant et après action de carbonate de magnésium suivie d'une centrifugation.

Nos chiffres sont les suivants :

Fer sérique en μg pour 100 ml	120	140	130
Fer sérique après traitement du sérum par CO_3Mg et centrifugation	118	138	130

La détermination de l'avidité du carbonate de magnésium vis-à-vis du fer a été réalisée dans les mêmes conditions que celle du carbonate de calcium.

Nous avons constaté que le fer bivalent n'est précipité qu'après un temps plus ou moins long correspondant sans aucun doute au temps nécessaire à son oxydation.

Des essais effectués avec le fer trivalent(alun de fer) sont très satisfaisants. Voici un de ces essais.

Nous ajoutons à une solution contenant 200 μg de fer+++ dans un volume de 20 ml, des quantités croissantes de carbonate de magnésium, nous agitons soigneusement et après un contact de 5 minutes, nous centrifugeons et nous dosons le fer restant en solution.

CO_3Mg en g.	0	0,050	0,100	0,200	0,500	0,750	1	2
Fer restant en solution en μg .	100	14	3,4	2,8	0,5	0,5	0	0

Ces résultats prouvent que l'activité du carbonate de magnésium vis-à-vis du fer ferrique est beaucoup plus grande que celle du carbonate de sodium.

Nous avons donc poursuivi nos essais avec le carbonate de magnésium et nous inspirant de la technique de RAMSAY, nous avons utilisé le mode opératoire suivant pour déterminer la capacité de saturation de la sidérophiline d'un sérum :

Nous avons d'ailleurs utilisé cette propriété du carbonate de magnésium pour débarrasser une eau de toute trace de fer.

Dans un tube à centrifuger :

- 2 ml de sérum
- 4 ml de solution ferrique à 500 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ obtenue par dilution d'une solution d'alun dans HCl N/200

agiter, attendre 5 minutes et ajouter 0,500 g de carbonate de magnésie, agiter, attendre 10 minutes, centrifuger et doser le fer dans le liquide surnageant.

Nous avons obtenu par cette méthode des résultats correspondant aux chiffres indiqués pour un sérum normal, soit 350 environ.

La méthode de RAMSAY a d'ailleurs été choisie par PLANAS et de CASTRO (118) pour étudier le taux de fer sérique et la capacité de liaison du fer chez divers mammifères.

4 - Action sur la catalase

a) Effets du fer et de différents métaux sur l'activité catalasique du sérum.

Nous nous sommes demandé si l'action des métaux que nous avons envisagés du point de vue macroscopique sur les protéines et les hématies pouvait se traduire par un phénomène biochimique aisément mesurable. VINCENT et BLACKBURN, comme nous l'avons dit ont envisagé la perte de potassium par les hématies (154). Nous avons choisi une protéine bien définie la catalase. Nous avons mesuré l'activité catalasique du sérum sanguin en présence de sel ferrique et d'autres ions métalliques.

Cet enzyme se rencontre dans toutes les cellules animales. La protohématine que l'on peut obtenir cristallisée, est le groupement prosthétique de cet enzyme. Chaque molécule contient quatre atomes de fer.

C'est à l'influence du plomb sur cet enzyme que HUZDIC et CREPINKO attribuent les altérations globulaires constatées dans l'intoxication plombique. Ils mettent en évidence in vitro un abaissement de l'activité catalasique du sérum proportionnel à la quantité de plomb en présence (139)

Chez l'animal vivant, les observations de DI PRISCO semblent en contradiction avec les précédents, puisque l'activité catalasique du sang de lapin intoxiqué par le plomb ou le manganèse est augmentée, en particulier dans le cas du plomb.

Il est vrai que l'auteur indique que ces résultats sont obtenus aussitôt après l'administration (44).

Nous avons utilisé la technique de DILLE et WATKINS dont se sont servis RUZDIC et CREPINKO dans leurs expériences sur le plomb (43).

Technique

1 - Réactifs :

Solution saline tamponnée à pH 6,8 (0,006 M - tampon phosphaté) de H_2O_2 , 0,02 N. Elle est préparée par mélange extemporané de :

- 100 ml de solution de ClNa à 85 %
- 49 ml de solution de PO_4Na_2H , 12 H_2O à 23,86 g/l soit M/15
- 51 ml de solution de PO_4H_2K à 9,078g/l soit M/15
- 900 ml d'eau distillée
- 1,2 ml de solution de H_2O_2 à 100 volumes.

Ce mélange ne se conserve pas plus d'une journée. Pour des expériences qui durent la journée entière, nous n'avons pas observé de variations.

Solution d'acide sulfurique à 5 %

Solution d'iodure de potassium à 10 %

Solution de molybdate d'ammonium à 1 %

Solution d'hyposulfite de sodium N/100

11 - Mode opératoire

Dans une petite fiole d'Erlenmeyer sont introduits et laissés en contact pendant 30 minutes :

- 0,2 ml de sérum
- 1 ml de solution de sel métallique dont on veut tester le pouvoir d'inhibition sur la catalase sérique.

- ensuite 10 ml de substrat (H_2O_2 en solution tamponnée).

L'action enzymatique est arrêtée après 30 minutes de contact à 22°-23° par 10 ml de SO_4H_2 à 5 %.

On ajoute enfin 5 ml 1K à 10 %

et III gouttes de solution de molybdate. Après 3 minutes on titre par l'hyposulfite en présence d'empois d'amidon.

Nous avons pratiqué nos essais sur des dilutions M/10, M/100 et même M/1000 de divers sels métalliques. Nous préparions en outre un essai à blanc pour titrer l'eau oxygénée, un témoin contenant du sérum, la différence des deux dosages indiquant le pouvoir catalasique du sérum et un témoin d'action propre éventuelle du métal sur les divers réactifs. Ce dernier essai, nous a fait renoncer au dosage d'une activité anticatalasique du chloriurate de sodium, la réduction de KI en I constituant une méthode de dosage de l'or trivalent.

Etant donné que la solution tamponnée d' H_2O_2 contient des phosphates, nous avons craint qu'elle ne perturbât l'action de certains ions métalliques et après l'avoir utilisée dans nos premiers essais, nous avons préféré y renoncer.

Résultats

Nous avons inscrit dans le tableau page 77 nos résultats détaillés. Les unités d'activité anticatalasique sont exprimées suivant les données de DILLE et WATKINS (43) par le nombre de ml d' H_2O_2 décomposés dans les conditions de concentrations du substrat et de durée de réactions indiquées. (Graphique page 78).

L'activité anticatalasique telle que nous venons de la définir classe les ions métalliques essayés dans l'ordre suivant :

$\text{Hg} > \text{Fe}^{+++} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Ag} > \text{Mn} > \text{Ba}$

Quatre métaux se sont montrés inactifs vis-à-vis de l'action enzymatique de la catalase : Zn, Cd, Ni, Co.

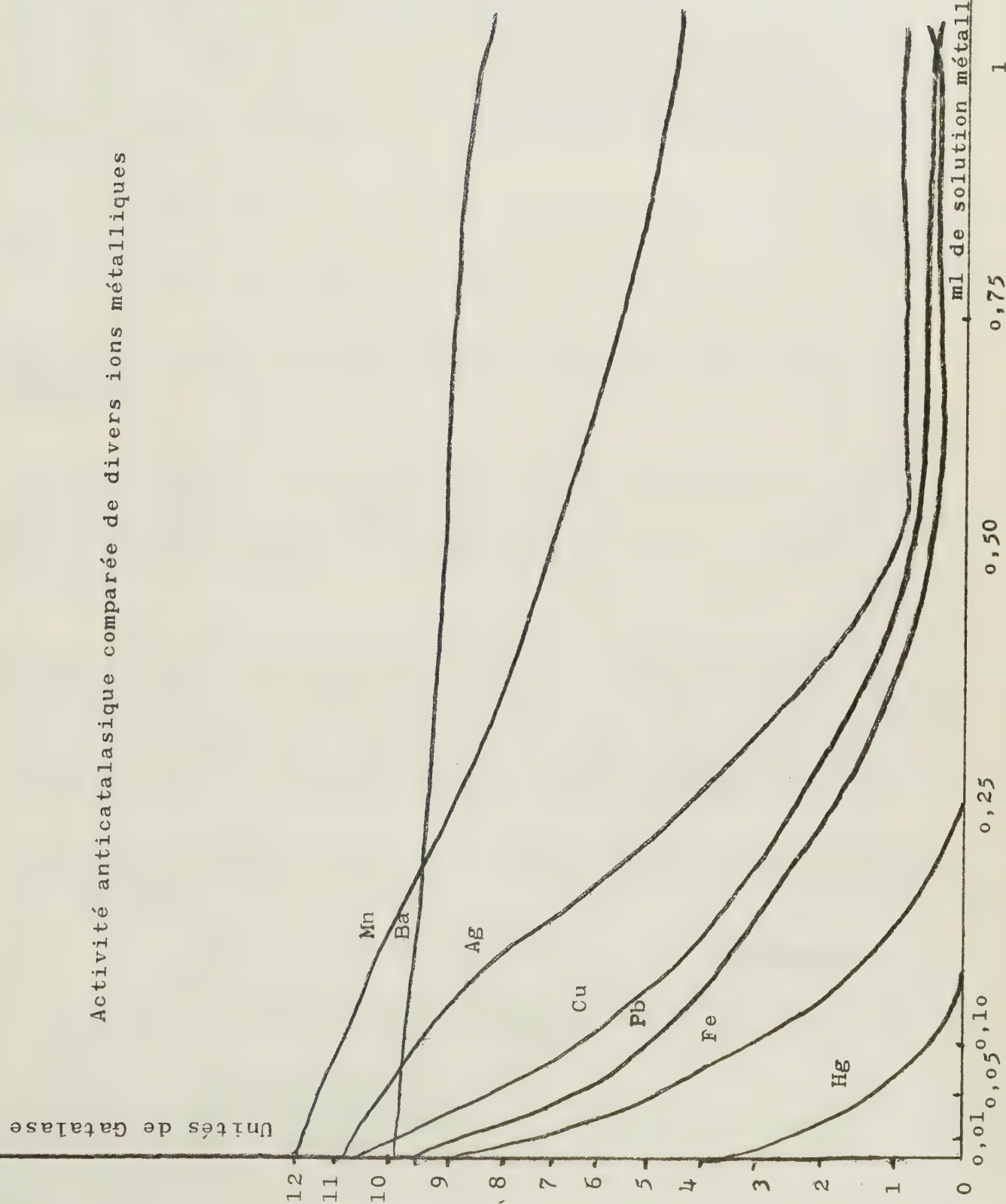
Si nous comparons la liste d'activité ci-dessus avec celle que nous avons établie dans l'agglutination des hématies (page 21) ou la précipitation des protéines (page 60), nous constatons le même rapprochement Fe^{+++} , Cu et Pb.

L'action des métaux sur les protéines et les hématies, peut donc se traduire par un phénomène biochimique aisément mesurable.

b) Influence de l'isoniazide sur les effets du fer, du cuivre et du zinc sur l'activité catalasique de l'hémoglobine.

	Volume d'H ₂ O ₂ décomposé (exprimé en ml)											
Solution métalliq en ml	M/1000 0,1 0,25 0,50 0,75				M/100 0,1 0,50 1			M/10 0,25 0,50 0,75 1				
Baryum												
Témoin					23	23	23	23	23	23	23	
Essai					13,2	13,2	13,2	13,8	13,8	14	14,9	
Unités					9,8	9,8	9,8	9,2	9,2	9	8,1	
Manganèse												
Témoin					23,3	23,3	23,3	23,3	23,3	23,3	23,3	
Essai					12,2	12,1	11,7	13,7	15,4	17,7	17,4	
Unités					11,1	11,2	11,6	9,6	7,9	5,4	5,9	
Argent												
Témoin					23,7	23,7	23,7	23,7	23,7	23,7	23,7	
Essai					13,2	13,6	14	18,3	22,6	22,6	22,6	
Unités					10,5	10,1	9,7	5,4	1,1	1,1	1,1	
Plomb												
Témoin	23,2	23,2	23,2		23,2	23,2	23,2	23,2	23,2	23,2	23,2	
Essai	14,1	14,1	14,4		15,6	17,1	-	20,4	22,6	22,9	22,9	
Unités	9,1	9,1	8,8		7,6	6,1	-	2,8	0,6	0,3	0,3	
Cuivre												
Témoin					23	23,2	23,7	24,8	26,6	27,8	30,2	
Essai					13,6	15,4	17,5	22,6	24,4	27	30,2	
Unités					9,6	7,8	6,2	2,2	2,2	0,8	0	
Fer												
Témoin					23	23	23,8	25	27	29	31	
Essai					14,4	17,4	20,8	24,9	27	29	31	
Unités					9,6	5,6	3	0,1	0	0	0	
Mercure												
Témoin	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	
Essai	14,7	18,9	19	19,7	20,4	22	23	23	23	22,9	23	
Unités	8,3	4,1	4	3,3	2,6	1	0	0	0	0,1	0	

Activité anticatalasique comparée de divers ions métalliques



Nous étant intéressé aux complexes métalliques de l'isoniazide (INH) et à leur stabilité vis à vis de protéines tissulaires (16), nous avons poursuivi notre expérimentation sur l'activité catalasique lorsque nous avons pris connaissance d'une publication de MAHER et coll. (100) sur le rôle d'ions métalliques dans l'inhibition de la catalase de foie, par l'isoniazide. Le complexe INH-métal serait capable d'entrer en compétition avec H_2O_2 sur les sites servant de substrat dans la molécule de catalase. Il en résulterait une accumulation d' H_2O_2 très toxique, à laquelle est attribuée assez hypothétiquement l'activité antituberculeuse de INH.

L'ordre d'activité anticatalasique indiqué par les auteurs est :



Cet ordre est tout différent de celui que nous avons trouvé dans nos expériences sur le sérum. L'activité est mesurée ici sur un enzyme pur.

L'addition d'INH à ces divers ions métalliques crée une véritable potentialisation de leurs effets inhibiteurs sur la catalase. Nous en retiendrons les résultats obtenus sur Fe^{+++} , Zn Cu^{++} parce que nos expériences ont porté sur ces 3 métaux : l'activité anticatalasique est multipliée environ par 4 pour Zn 2,5 pour Fe^{+++} , 1,5 pour Cu^{++} .

Nous nous sommes adressé à l'activité catalasique des globules rouges. Des hématies provenant de sangs destinés à la transfusion sont lavées, mises en suspension dans du soluté isotonique de Cl Na puis hémolysées par dilution avec de l'eau distillée. Une centrifugation élimine les stromas. La solution est amenée à une dilution telle que son activité catalasique permette des dosages et des mesures d'inhibition en opérant sur 1 ml.

Dans nos expériences, le substrat, 10 ml d' H_2O_2 , exige environ 22 ml d' $S_2O_3Na_2$ 0,01 N et 1 ml de la dilution d'hémoglobine décompose 8 à 9 ml d' H_2O_2 .

Nous avons utilisé la même technique que précédemment.

Inhibition catalasique exprimée en ml d' H_2O_2 restant en fin de réaction

Cu	0,5 ml	M/1000		4,6
+ INH	N/1000	0,5 ml		6,3
+ INH	N/1000	2 ml		7,1

Fe	0,1 ml	M/1000		8,1
+ INH		N/1000	0,1 ml	 9,2
Zn	0,5 ml	M/1000		0
+ INH		N/1000	0,5 ml	 1,2
+ INH		N/1000	2 ml	 6,2

Nous retrouvons bien l'augmentation d'activité par INH signalée par MAHER et coll. Il s'agit effectivement d'une potentialisation car INH n'a aucun effet anticatalasique par lui même. L'essai concernant la faible dose de Zn, inactive par elle même, est particulièrement net.

Cette potentialisation n'est pas aussi importante que celle qui a été décrite. Mais il ne s'agit pas ici de la catalase pure extrait du foie. Nous remarquerons aussi que le Zn n'a pas d'activité anticatalasique décelable vis à vis du sérum.

RESUME & CONCLUSIONS

Nous avons rappelé dans l'Introduction à notre Travail les formes sous lesquelles se présente le fer dans l'organisme, parce que la diversité de ses liaisons protéiques est à l'origine de nos recherches.

Nous avons choisi comme substrat organique dans beaucoup de nos expériences l'hématie humaine. Nous avons indiqué quels étaient ses constituants protéiques, parce que susceptibles d'intervenir dans la fixation du fer, et nous avons insisté sur la notion de fer non hémoglobinique.

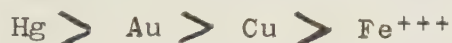
Le substrat étant ainsi précisé, nous avons décrit le protocole d'expérimentation et la méthode de dosage du fer que nous choissions.

Une série d'essais préliminaires nous a montré que le sulfate ferreux ammoniacal, le citrate de fer ammoniacal, le chlorure ferrique ne se prêtaient pas aux recherches que nous entreprenions. Le sulfate ferrique ammoniacal (alun de fer), au contraire, convenait à condition de se mettre à l'abri d'une hydrolyse spontanée. Dans ce but, nous avons déterminé la concentration du sel de fer et la durée des expériences compatibles avec une stabilité indispensable à la fidélité des résultats.

En nous basant sur l'agglutination et sur l'hémolyse des hématies provoquées par les ions métalliques, nous avons établi deux échelles d'activité :

Activité agglutinante	$\text{Cu} > \text{Fe}^{+++} > \text{Pb} > \text{Zn} > \text{Cd}$
Activité Hémolysante	$\text{Au} > \text{Hg} > \text{Ag}$

Un complément à cette classification nous est apporté par l'influence des ions métalliques sur l'hémolyse provoquée par l'uréthane. Les quatre cations essayés favorisent cette hémolyse dans l'ordre



La confrontation de ces résultats avec des données acquises nous permet d'établir une correspondance assez satisfaisantes avec ce qu'on sait de la fixation en surface, sur les stromas ou sur l'hémoglobine des ions métalliques étudiés. Nous avons également fait appel à un classement basé sur la modification de perméabilité de l'hématie dont l'ordre coïncide avec celui que nous avons établi en présence d'uréthane.

Nous avons montré que la quantité de fer fixée par les hématies croît en fonction de la quantité offerte jusqu'à une certaine dose à partir de laquelle les résultats deviennent infidèles. Une diminution plus ou moins irrégulière de la surface totale globulaire due à l'agglutination semble devoir en être rendue responsable.

Nous avons expliqué par la périodicité du phénomène d'agglutination le fait assez inattendu que la quantité de fer fixée augmente avec le nombre d'hématies jusqu'à un maximum puis décroît. Nous avons mis en évidence le même fait sur des levures.

Enfin, nous avons trouvé qu'en rendant le milieu hypertonique nous évitions l'agglutination des hématies et, par là-même, la fixation du fer, ou du cuivre, était plus facile.

Nous avons cherché s'il existait une compétition des métaux vis-à-vis des hématies, ce qui serait un argument en faveur d'une identité de leurs récepteurs sur ces cellules.

Après avoir donné les raisons qui nous faisaient choisir le fer, le cuivre et le zinc, nous avons mené plusieurs séries d'expériences. Malgré la diversité des protocoles et la variation des doses employées, nous n'avons observé aucune inhibition, mais au contraire une augmentation du taux de fixation de chacun des ions mis en concurrence.

Certaines acides aminés et EDTA dissimulent le fer et empêchent ainsi sa fixation sur l'hématie. A cette occasion, nous avons été mené à chercher le moyen de détruire le complexe Fe-EDTA pour rendre possible le dosage du fer par l'o-phénanthroline. Nous avons décrit les essais qui nous ont conduit à préconiser le chauffage à l'étuve à 60° ou l'addition d'eau oxygénée.

Dans la seconde Partie de notre Travail nous avons obtenu les résultats suivants :

Un essai de fixation de fer sur les tissus in vitro n'a pu être interprété valablement.

Le test de l'intestin isolé a confirmé l'action faiblement excitante du fer divalent et l'inactivité du fer trivalent, qui étaient déjà connues.

L'action précipitante de certains ions métalliques sur les protéines sériques nous a permis d'établir un ordre d'activité décroissante



Cet ordre diffère essentiellement de celui que nous avons établi d'après l'agglutination des hématies par la place occupée par le zinc. Par contre, le cuivre se trouve en tête des deux listes.

L'examen de plusieurs échelles d'affinité basées par les liaisons métalliques soit de divers groupements réactionnels des protéines soit d'acides aminés particuliers ne répondent pas totalement aux ordres que nous avons proposés. Le fer, qui retenait plus spécialement notre attention, se trouve tantôt absent des séries, tantôt à la dernière place, tantôt à la première.

La méthode électrophorétique confirme l'ordre d'activité Cu Fe⁺⁺⁺ qu'établissait nos expériences sur les hématies et sur les protéines du plasma.

A la suite de toutes ces comparaisons, nous ne pouvons pas attribuer à des liaisons précises la plus ou moins grande activité des ions métalliques vis-à-vis des globules rouges et vis-à-vis des protéines plasmatiques.

Pour mesurer la capacité de fixation du fer du sérum, nous avons pensé faire appel à une différence de solidité de liaison du fer avec la sidérophiline d'une part, avec un carbonate d'autre part. Nos essais montrent que la liaison au carbonate de calcium est plus faible que la liaison au carbonate de magnésium et que seul ce dernier peut être utilisé dans le dosage de la sidérophiline.

Enfin, dans un dernier chapitre nous comparons l'activité du fer⁺⁺⁺ et de différents métaux sur l'activité catalasique du sérum dans le but de trouver une expression biochimique de l'affinité de ces ions métalliques pour une protéine.

L'activité anticatalasique se traduit dans l'ordre suivant:

Hg > Fe+++ > Pb > Cu > Ag > Mn > Ba

Nous notons l'efficacité supérieure du fer sur le cuivre et surtout l'inactivité du zinc. Nous remarquerons ce pendant que Fe+++ , Pb, Cu sont voisins comme ils l'étaient dans la série d'agglutination, quoique dans un ordre différent.

Un effet potentialisateur de l'isoniazide sur l'activité anticatalasique a été signalé. Nous le confirmons par une expérience portant sur le fer, le cuivre et le zinc mis en présence d'un hémolysat et d'INH.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ALBERT (A.) - Quantitative studies of the avidity of naturally occurring substances for traces metals.
Bioch. J. 1950, 47, 531
- 2 - ALBERT (A.) - Avidity of terramycin and auremycin for metallic cations.
Nature 1953, 172, 201
- 3 - ANDERSON (H.M.), TURNER (J.C.) - Préparation and the haemoglobin content of red cell "Ghosts".
Nature 1959, 183, n° 4654, 112
- 4 - AUB (S.C.), REZNIKOFF (P.), SMITH (D.E.) - The effects of lead on red blood cells.
J. exp. Med. 1924, 151, 208
- 5 - BARKAN (G.) - Die Verteilung des leicht abspaltheren Eisens zwischen Blutkörperchen und Plasma und sein Verhalten unter experimentellen Bedingungen.
Ztsch. physiol. Chem. 1927, 171, 194.
- 6 - BAYER (E.), HAUSER (K.H.) - Eisen (III) Komplexe mit 3 un-geparten Elektronen.
Experientia 1955, II, 254
- 7 - BEHRENS (M.), TAUBERT (M;) - Über die Beziehungen zwischen Hemosiderin und Ferritin.
Ztsch. Physiol. Chom. 1951, 289, 116
- 8 - BERNARD (J.), BOIRON (M.), PAOLETTI (C.) - Le dosage du fer non hémoglobinique des hématies. Son intérêt au cours de certaines érythropathies.
Rev. Franç. Et. clin. Biol. 1958, 3, 367
- 9 - BERNHARD (W.) - Electron microscope studies on thin sections of human erythrocytes.
Nature 1952, 170, 359
- 10 - BESSIS (M.) - Le cycle du fer vu au microscope électronique à l'état normal et dans certaines anémies.
Rev. Praticien 1959, 9, 1543
- 11 - BESSIS (M.), BRETON-GORIUS (J.) - Trois aspect du fer dans des coupes d'organes examinés au microscope électronique (ferritine et dérivé, dans les cellules intestinales, les érythroblastes et les cellules réticulaires).
C.R. Ac. Sc. 1957, 245, 1271
- 12 - BESSIS (M;), BRETON-GORIUS (J.) - Accumulation de granules ferrugineux dans les mitochondries des érythroblastes.
C.R. Ac. Sc. 1957, 244, 2846

- 13 - BESSIS (M.), BRETON-GORIUS (J.) - Etude au microscope électronique des granulations ferrugineuses des érythrocytes.
Rev. Hématol. 1957, 12, 43
- 14 - BESSIS (M.), BRETON-GORIUS (J.) - Aspects de la molécule de ferritine et d'apoferritine au microscope électronique.
C.R. Ac. Sc. 1960, 250, 1360
- 15 - BESSON (S.), BLIN (Cl.) - Le dosage du fer⁺⁺⁺ dans le complexe Fe-EDTA.
Bull. Soc. Pharm. Nancy 1960, n°47, 23
- 16 - BESSON (S.), BLIN (Cl.) - TAVERNIER (J.) - Comportement de l'hydrazide de l'acide isonicotinique et de sa combinaison cuivrique vis-à-vis des tissus in vitro.
Bull. Soc. Pharm. Nancy. 1957, n° 33, 4
- 17 - BESSON (S.), GEYER (O.) - A propos de l'action du cuivre sur les hématies.
Bull. Soc. Pharm. Nancy. 1956, n°9, 10
- 18 - BESSON (S.), SIEST (G.), BLIN (Cl.) - Action propre des ions métalliques Hg, Au, Fe, Cu, sur les hématies et action favorisante sur l'hémolyse par l'uréthane
Bull. Soc. Pharm. Nancy 1959, n° 43, 9.
- 19 - BESSON (S.) TAVERNIER (J.) - A propos de l'action du cuivre sur les protéines.
Bull. Soc. Pharm. Nancy 1956, n°9, 10
- 20 - BLANC (B.), ISLIKER (H.) - Isolement et caractérisation de la protéine rouge sidérophile du lait maternel : la lactotransferrine.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1961, 43, 929
- 21 - BLOWERS (R.), CLARKSON (E.M.) MAIZELS (M.) - Flicker phenomenon in human erythrocytes.
J. Physiol. 1951, 113, 228
- 22 - BOIRON (M.), PAOLETTI (C.), BERNARD (J.) - Metabolisme normal et pathologique du fer préhémoglobinique.
Semaine des Hôpitaux, 1958, n° 40-41
- 23 - BOIRON (M.), PAOLETTI (Cl.) TUBINA (M.) - Etudes sur la pénétration du fer dans les globules rouges in vitro.
C.R. Acad. Sci. 1955, 241, 1165
- 24 - BONE (J.N.), O'DAY (D.W.) - Synthesis and biotesting of me-

tallic surfactants.

J. am. pharm. Assoc. (Sc. ed.) 1958, 47, 795

- 25 - BRENDSTRUPP (P.) - Serum iron, total iron binding, capacity of serum and serum copper in normals
Scand. J. Clin. Labor. Invest. 1955, 5, 312
- 26 - BRILL (A.S.), WILLIAMS (R.J.P.) - The absorption spectra, magnetic moments and the binding of iron in some haemoproteins.
Bioch. J. 1961, 78, 246
- 27 - CADWALLADER (D.E.), HUSA (W.J.) - The effect of zinc acetate on red corpuscles.
J. Am. Pharm, Assoc. (Sc. ed.) 1958, 47, 703
- 28 - CANALS (E.), MARIGNAN (R.), CORDIER (S.) - Adsorption de quelques ions métalliques en solutions très diluées.
Ann. Pharm. Fr. 1949, 7, 502 et 1950, 8, 368
- 29 - CARISON (L.A.), FRIBERG (L.) - The distribution of cadmium in blood after repeated exposure.
Scand. J. Clin. Labor. Investig. 1957, 2, 67
- 30 - CAZAL (P.) - Erythrocytes et Erythropathies Masson, Paris, 1957
- 31 - CHABEREK (S.), MARTELL (A.E.) - Organic sequestering agents
John Wiley & Sons, Inc. N.Y. 1959
- 32 - CHENGK (L.), LOTT (P.F.) - Reaction of hydrogen peroxide with complexes of (ethyleno-dinitrilo) tetracetic acid and nitrilotriacetic acid.
Anal. Chem. 1956, 28, 462
- 33 - CLARKSON (T.W.), KENCH (J.E.) - Uptake of lead by human erythrocytes in vitro.
Bioch. J. 1958, 69, 432
- 34 - CLAUSEN (J.), MUNKNER (T.) - Transferrin in normal cerebrospinal fluid.
Nature, 1961, 189, 60
- 35 - COEUR (M.A.), BAUDOUIN (N.) - Dosage du Fe^{+++} par le versenate en présence d'acides perturbateurs (acides tartrique, citrique, oxalique).
Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon. 1959, 3, 53

- 36 - CODDINGTON (A.), PERKINS (D.I.) - The effect of chemical modification on the uptake of cobalt (II) ions by human serum albumin, in aqueous solution.
Bioches. J. 1958, 69, 45 F
- 37 - CORSINI (J.P.), MANFREDI (G.), PINTOZZI (P.), CACCIARI (E.) - Protéine aminoacidi lipidi total e frazionati nel globulo rosso in toto e nella sua parte stromatica.
La Clinica Pediatrica 1959, 41, 279
- 38 - CRAIG (J.P.), CARRETT (A.G.), WILLIAMS (H.B.) - The ovalbumin - chlore auric acid reaction
J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 571
- 39 - DATTA (S.P.), LEBERMAN (R.), RABIN (B.R.) - Relationship between proton end metal binding by some peptides, amino-acid amides and aminoacides.
Nature 1959, 183, 745
- 40 - DAUBINET (G.) - Le métabolisme du fer chez le nourrisson
Thèse Med. Nancy 1957
- 41 - DEJARDIN (J.) - Contribution à l'étude de la libération du fer de l'hémoglobine.
Acta Biol. Belg. 1943, 3, 205
- 42 - DEJARDIN (J.), - LAMBRECHTS (A.) - Une méthode simplifiée de dosage du fer plasmatique.
Acta Biol. Belg. 1943, 3, 208
- 43 - DILLE (R.S.); WATKINS (Ch.H) - A method for the determination of plasma catalase and the values obtained in normal adults.
J. Lab. Clin. Med. 1948, 33, 480
- 44 - DI PRISCO (L.) - Sul contenuto in catalasi del sangue nelle intossicazioni da Fosforo, piombo, manganese e nichelio
Arch. Farmacol. sperim. Sci affini 1933, 55, 123
- 45 - DOMINICI (G.), MENGHINI (G.), DALLA TORRE (M.), ORLANDI (F) - Sidérose et chromatose hépatiques.
Rev. intern. Foie 1958, 1.
- 46 - DOUSTE-BLAZY - les lipides des hématies
Exp. ann. Bioch. Med. 1959, 21ème série
- 47 - DREYFUS (J.C.) SCHAPIRA (G.) - le fer. Biochimie. Physiologie. Pathologie.
Expansio, scientifique française - Paris 1958

- 48 - EDELHOCH (H.), KATCHALSKI (E.), NAGBURG (R.H.), HUGHES (W.L.), EDSALL (J.T.) - Dimerization of serum mercaptalbumin in presence of mercurials I. Kinetic and equilibrium studies with mercuric salts.
J. Am. Chem. Soc. 1953, 75, 5058
- 49 - EDSALL (J.T.) - Aspecte actuels de la biochimie des acides aminés et des protéines.
Actualités biochem. n° 20, Masson, Paris 1958
- 50 - EDSALL (J.T.), FELSENFELD (G.), GOODMAN (D.S.), GURD (F.R. N.) - The association of imidazole with the ions of zinc and cupric copper.
J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 3054
- 51 - FALK (J.E.), PHILIPPS (I.N.) - Banding of haem to protein in haemoglobin and myoglobin.
Nature 1959, 184, 1651
- 52 - FARRANT (J.L.) - An electron microscopic study of ferritin
Bioch. Bioph. Acta 1954, 13, 569
- 53 - FEHER (T.), MATKOVICS (B.) - Chemical constitution of the red blood cell membrane
Nature 1960, 187, 702
- 54 - FEINSTEIN (A.R.), BETHARD (W.E.), CARTHY Mc (J.D.) - A new method using radioiron for determining the iron binding capacity human serum.
J. Lab. Clin. Med. 1953, 42, 907
- 55 - FESSAS (P.), MASTROKALOS (N.) - Demonstration of small components in red cell haemolysates by starch-gel electrophoresis.
Nature 1959, 183, 1261
- 56 - FOREMAN (H.), TRUJILLO (T.T.) - The metabolism of C^{14} labeled ethylene diaminetetraacetic acid in human beings.
J. Lab. Clin. Med. 1954, 43, 566
- 57 - FLURY (F.) - Blei.
Hdb. experim. Pharmacol. von A. und. M. HEFFTER
3 Bd. 2 Teil. Berlin 1934.
- 58 - CALLAIS (F.) - Chimie minérale théorique et expérimentale (Chimie électronique).
Masson - Paris 1950
- 59 - GIBLETT (E.R.), HICKMAN (C.G.), SMITHIES (O.) - Serum transferrins.
Nature 1959, 183, 1589

- 60 - GRANICK (S.) - Ferritin : its properties and significance for iron metabolism.
Chem. Rev. 38, 379
- 61 - GRANICK (S.) - Structure and physiological functions of ferritin.
Physiol. Rev. 1951, 31, 489
- 62 - GRANICK (S.), HAHN (P.F.) - Ferritin. VIII. Speed of uptake of iron by the liver and the conversion to ferritin iron
J. biol. Chem. 1944. 155. 661
- 63 - GRANICK (S.), MICHAELIS (S.L.) - Ferritin. II. Apoferritin of horse spleen.
J. biol. Chem. 1943, 147, 91
- 64 - GRIGARZIK (H.), PASSOW (H.) - Versuche zum mechanismus der Bleiwirkung auf die Keliumpermeabilität roter Blutkörperchen.
Pfl. Archiv. 1958, 267, 73
- 65 - GROVES (M.L.) - The isolation of a red protein from milk
J. Am. Chem. Soc. 1960, 82, 3345
- 66 - GRUNEBERG (H.) - Siderocytes : a new kind of erythrocytes.
Nature 1941, 148, 114
- 67 - GUILLOT (M.) - Conditions d'emploi de la colorimétrie en chimie analytique.
In chimie analytique de J.A. GAUTIER, 2ème série,
P. 3, Masson-Paris.
- 68 - GURD (F.N.R.), WILCOX (P.E.) - Complex formation between metallic cations and proteins, peptides, and amino acids
Adv. Prot. Chem. 1956, II, 312
- 69 - HAMM (R.) - Uber die Mineralstoffe des Säugetier muskels. II. Mittheilung. Der Bindungs zustand von Magnesium, Calcium, Zink. Eisen und Phosphat in Muskel post mortem. Ztsch. Lebensm. Unters Forsch. 1959, 110, 95
- 70 - HARRISSON (P.M.) - The structures of ferritin and apoferritin some preliminary X-Ray data.
J. Molec. Biology 1959, I, 69
- 71 - HEILMEYER (L.) - Das Speichereisen (ferritin und Hämosiderin).
Clin. Chim. Acta 1957, 2, 159

- 72 - HEMMELER (G.) - Metabolisme du fer
Masson, Paris 1951
- 73 - HEUBNER (W.) - Allgemeines sur Pharmakologie der Metalle.
in Handb. experim. Pharmakol. von A. und W.
HEFFTER 3 Bd. 2 Teil Berlin 1934
- 74 - HILL-COTTINGHAM (D.G.) - Photosensitivity of iron chelates.
Nature 1955, 175, 347
- 75 - HOUCHIN (D.H.), MUNN (J.J.), PARNELL (B.L.) - A method for
measurement of red cell dimensions and calcula-
tion of mean corpuscular volume and surface
area.
Blood 1958, 13, 1185
- 76 - HOYER (G.) - Adsorption photometric determination of serum
iron with 1-10 phenanthroline
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1950, 2, 125
- 77 - JACOBS (N.H.) - Properties of surface of erythrocytes
(Blutkörperchen)
Ann. N.Y. As. Sc. 1950, 50, 824
- 78 - JANDI (J.H.), IMMAN (J.K.), SIMMINS (R.I.), ALLEN (D.W.) -
Transfer of iron from serum iron binding pro-
tein to human reticulocytes.
J. Clin. Invest. 1959, 38, 161
- 79 - JANDL (J.U.), SIMMONS (R.I.) - The agglutination and sensi-
tization of red cells by metallic cations : in-
teractions between multivalent metals and the
red-cell membrane.
Brit. J. Haemat. 1957, 3, 19
- 80 - JENKINS (C.E.), THOMSON (M.L.) - The non haemoglobin cellu-
lar iron in anaemia
Brit. J. exp. Pathol. 1938, 19, 417
- 81 - JOHANSSON (B.) - Isolation of an iron-containing red protein
from human milk.
Acta Chemica Scand. 1960, 14, 510
- 82 - JONES (S.S.), LONG (F.A.) - Complex ions from iron and ethy-
lenediamine tetra-acetate. General properties
and radioactive exchange.
J. Physic. Chem. 1952, 56, 25
- 83 - JUNG (F.) - Zu Pathologie der roten Blutkörperchen. II. Mit-
teilung. Wirkungen einiger Metallsalze.
Arch. exp. Path. Pharmakol. 1947, 204, 139
- 84 - KLEIN (E.) - Die direkte Bestimmung der latenten Eisenbin-
dungs kapazität des Blutes.
Acta haemat. 1957, 12, 263

- 85 - KLOTZ (I.M.) - Protein molecules in solution
Circulation 1960, 21, 828
- 86 - KLOTZ (I.M.), LOH-MING (W.C.) - Mediation by metals of the
binding of small molecules by proteins.
J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 805
- 87 - KLOTZ (I.M.), URQUHART (J.M.), FIRSS (H.A.) - Interactions
of metal ions with the sulfhydryl group of
serum albumin.
J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 5537.
- 88 - KLUMPP (Th. G.) - The variability of non hémoglobin iron.
J.Clin. Invest. 1935, 14, 351
- 89 - KRUGERS (J.), AGTERDENBOS (J.) - Photosensitivity of the
iron (III) ethylene diamine tetraacetate com-
plex.
Nature 1957, 180, 45
- 90 - LAL (H.) - Hydrogen ion equilibria and the interaction of
Cu "and Co" with bovine serum albumin.
J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 844
- 91 - LANGE (J.) - Eisen, Kupfer und Eiweisse am Beispiel der Le-
berkrankheiten. Mit Besonderer Berücksichtigung
der haemachromatose und der Hepatocere-
bralen Degeneration.
Thèse BONN - Georg Thieme Verlag - STUGGART
1958
- 92 - LAURELL (C.B.) - Studies on the transportation and metabo-
lism of iron in the body with special reference
to the iron binding component in human plasma.
Acta physiol. Scand. 1947, 14, Suppl. 46, 1-129
- 93 - LI (N.C.), MANNING (P.A.) - Some metal complexes of sulfur
containing amino-acide.
J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 5225
- 94 - LOCQUIN (M.) - La structure des erythrocytes.
Revue d'Hématologie 1950, 5, 226
- 95 - LOEWUS (M.W.), FINEBERG (R.A.) - The incorporation of iron
by apoferritin.
Bioch. Bioph. Acta 1957, 26, 441
- 96 - LONTIE (R.) - The binding of copper in Haemocyanine
Clin. Chim. Acta, 1958, 3, 68
- 97 - LUDEWIG (S.) - Hemosiderin. Iron extraction studies.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1959, 100, 299

- 98 - MAGNAN de BORNIER (B.) - Sur la structure physicochimique de la ferritine. Rôle du fer.
Sem. Hôp. (Path. Biol.) 1958, 739
- 99 - MAGNAN de BORNIER (B.), BENEZECH (B.) - Ferritine et Apoferritine. Viscosité des solutions et hydratation de l'apoferritine.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39, 1335
- 100 - MAHER (J.R.), SPEYER (J.F.), LEVINE (M.) - Studies on the mode of action of isoniazid. I. The role of trace metals in the inhibition of bovine liver catalase by isoniazid.
Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis. 1958, 77, 50
- 101 - MANDEL (E.E) - Serum iron and iron binding capacity in Clinical. diagnosis.
Clin. Chem. 1959, 5, 1
- 102 - MANDEL (P.), CHAMBON (P.) - Les nucléotides acido-solubles des globules rouges humains.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1959, 41, 989-994
- 103 - MARGOSHES (M.), VALBE (B.L.) - Cadmium protein from equine kidney corteix.
J. Am. Chem. Soc. 1957, 79, 4813
- 104 - MAURI (C.), TORELLI (U.), GROSSI (G.) - Ricerche sugli aminoacidi liberi negli eritrociti dell'uomo normale
Haematologica. Ital. 1958, 43, 1265
- 105 - MAZUR (A.), BAEZ (S.), SHORR (E.) - The mechanism of iron releasse from ferritin as related to its biological properties.
J. biol. Chem. 1955, 213, 147
- 106 - MAZUR (A.), LITT (H.), SHORR (E.) - The relation of sulfhydryl groups in ferritin to its vasodepressor activity.
J. biol. Chem. 1950, 187, 485
- 107 - MAZUR (A.), LITT (H.), SHORR (E.) - Oxidation and reduction of ferritin sulfhydryldisulfide groups by liver
J. Biol. Chem. 1950, 187, 497
- 108 - MITCHELL (J.), HALDEN (E.R.), JONES (F.), BRYAN (S.), STIRMAN (J.A.), MUIRHEAD (E.) - Lowering of transferrin during iron absorption in iron deficiency
J. Lab. Clin. Med. 1960, 56, 555

- 109 - MENEGHETTI (F.) - Emolisi e fissazione. II. Azione comparata emolitica e fissativa dei metalli.
Arch. Scienze biol. 1921, 2, 285
- 110 - MONTREUIL (J.), MULLET (S.) - Isolement d'une lactosidérine du lait de femme.
C.R Acad. Sc. 1960, 250, 1736
- 111 - O'HAGAN (J.E.) - The iron-protein lick in haemoglobin and myoglobin.
Nature 1959, 183, 393
- 112 - PAOLETTI (G.), DURAND (M.), GOSSE (Ch.), BOIRON (M.) - Absence de consommation de la sidérophiline au cours de la synthèse de l'hémoglobine "In vitro"
Rev. Franç. Et/ Clin. Biol. 1958, 3, 259
- 113 - PASCAL (P.) - Notions élémentaires de chimie générale.
Masson, Paris 1953
- 114 - PASSOW (H.), WEISS (Ch.) - Das Grenzflächen - pH roter Blutkörperchen in Gegenwart von Schwermetallionen.
Pfl. Archiv. 1960, 271, 374
- 115 - PAULING (L.) - Chimie générale, Dunod, Paris 1951
- 116 - PELLETIER (S.) - Contribution à l'étude des complexes métalliques des amino-acids.
Thèse Sc. Phys. Paris 1960
- 117 - PHILIPPOT (J.), MAGNAN de BORNIER (B.) - Ferritine et Apoferritine. IV. Relayage par le sulfate d'ammonium et répartition du fer dans la ferritine.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1959, 41, 119
- 118 - PLANAS (J.), de CASTRO (S.) - Serum iron and total iron binding capacity in certain Mammals.
Nature 1960, 187, 1126
- 119 - PONDER (E.) - Passage des ions à travers la surface des érythrocytes et des cellules en général.
Rev. Hématol. 1959, 14, 294
- 120 - PONDER (E.) - Haemoglobin and "apparent protein" in the human red cell.
Nature 1959, 183, 1330
- 121 - RAJAPURKAR (M.V.) - Adrenergic blocking action of ferrons ion.
Arch. Intern. Pharmacod. 1960, 125, 431

- 122 - RAMSAY (W.N.M.) - The determination of the total (ironbinding capacity of serum).
Clin. Chim. Acta 1957, 2, 221
- 123 - RAO (N.S.N.), LAL (H.) - Binding of the cobaltous ions by native and modified serum albumins
J. Amer. Chem. Soc. 1954, 76, 4867
- 124 - RAO (N.S.N.), LAL (H.) - Metal protein interactions in buffer solutions Part. II. A polarographic study of the interaction of Zn and Co with bovine serum albumine.
J. Am. Chem. Soc. 1958, 80, 3222
- 125 - REED (C.I.F.), SWISNER (S.N.), MARINETTI (G.V.), EDEN (E.-G.) Studies of the lipids of the erythrocyte. 5. Quantitative analysis of the lipids of normal human red blood Cells.
J. Lab. Clin. med. 1960, 56, 281
- 126 - RICHTER (G.W.) - The cellular transformation of injected colloidal iron complexes into Ferritin and hemosiderin in experimental animals. A study with the aid of electron microscopy
J. Exp. Med. 1959, 109, 197
- 127 - RIECKER (G.), BUBNOFF (M. von) - Die intercellulare Plasmamenge im Erythrocytensediment. Untersuchungen zur Frage des Plasmafehlers bei der chemischen Analyse von Erythrocyten.
Z. ges. exper. Med. 1959, 132, 102
- 128 - RINGBOM (A.), SITTONEN (S.), SAXEN (B.) - The Fe (III)-EDTA H₂O₂ complex and its analytical use.
Anal. Chim. Acta 1957, 16, 541
- 129 - ROBINSON (A.E.), BECKETT (A.H.), DAR (R.N.) - The interaction of chelating agents with bacteria. Part II. Cation binding and the antibacterial effects of 8-hydroxyquinoline (Oxime).
J. Pharm. Pharmacol. 1960, 12, 385
- 130 - ROSE (N.), PEETOOM (F.) RUDDY (S.) MICHELI (A.), GRABAR (P.) Etude immunochimique des hémolisats des globules rouges humains.
Ann. Inst. Pasteur, 1960, 98, n°1, 70
- 131 ROY HAMMARLUND (E.R.), PEDERSEN-BJERGAARD (K.) - A simplified graphic method for the preparation of isotonic solutions.
J. Am. Pharm. Assoc. (SC.ED.) 1958, 47, 107
- 132 - RUGE (R.), RUMMEL (W.) - Beeinflussung der Urethanhämolyse durch Schwermetalle.
Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 1953, 217, 329

- 133 - RUZDIC (I.), CREPINO (I.) - Das Blei als Hemmatoff der Katalase wirkung.
Ztsch. physiol. Chem. 1958, 312, 22
- 134 - SALTMAN (P.), BOROUGHS (H.) - The accumulation of zinc by fish liver slices.
Arch. Bioch. Biophys. 1960, 86, 169
- 135 - SALTMAN (P.), FISKIN (R.D.), BELLINGER (S.B.), ALEX (T.)
The metabolism of iron by rat liver slices.
The effect of physical environnement and iron concentration.
J. Biol. Chem. 1956, 220, 741
- 136 - SALTMAN (P.), FISKIN (R.D.), BELLINGER (S.B.); ALEX (T.)
The metabolism of iron by rat liver slices.
The effect of chemical agents.
J. Biol. Chem. 1956, 220, 751
- 137 - SCHAPIRA (G.), DREYFUS (J.C.), SCHAPIRA (F.), - Dosage du fer sérique.
Sem; Hôp. (Arch. Biol. Med.) 1954, 2, 176
- 138 - SCHWIETZER (C.H.) - Untersuchungen über des hämosiderin
Acta Haemat. 1953, 10, 174
- 139 - SHODEN (A.), STURGEON (P;) - hemosiderin. I. A. physico-chemical study.
Acta haematol. 1960, 23, 376
- 140 - SIVARAMA SASTRY (K.), VISWANATHAN (L;), RAMIAH (A.), SARMA (P.S.) - Studies on the binding of $G_{5}Zn$ by equine erythrocytes in vitro.
Bioch. J. 1960, 74, 561
- 141 - STARKINSTEIN (E.) - Eisen. In handb experim. Pharmakol von A. und W. HEFFTER 3bd. 3 teil, Berlin 1934
- 142 - STAUFF (J.), UHLEIN (I.) - Einige Beobachtungen uber die Heeinflussung der Denaturierungsgeschwindigkeit von Proteinen durch Schwermetallsalze.
Bioch. Ztsch. 1958, 329, 549
- 143 - STEIN (W.D.) - N-terminal histidine at the active centre of à permeability.
Nature 1958, 181, 1662
- 144- STEINER (B.) - Le zinc en biologie et en pathologie animales Thèse vétérin. Alfort 1959, n° 39
- 145 - SURGENOR (D.M.), KOECHLIN (B.A.), STRONG (L.E.) - Chemical Clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. XXXVII. The meta-combining globulin of human plasma
J. Clin. Invest. 1949, 28, 73

- 146 - TANFORD (Ch.) - The effect of pH on the combinaison of serum albumin with metalls.
J. Chem. Am. Soc. 1952, 74, 211
- 147 - TAVERNIER (J.) - Etude expérimentale de la fixation de l'ion cuivre par les tissus animaux, les protéines sériques et les hématies.
Thèse Pharmacie (Etat), Nancy 1957
- 148 - TEITEL (A.), MARCUS (N.) - Physicochemical investigations of erythrocytes membranes.
Nature 1958, 181, 714
- 149 - TISHKOFF (G.H.), ROBSCHUIT-ROBBINS (F.S.), WHIPPLE (G.H.) - Variations in the stroma protein and lipid fractions related to experimental conditions.
Blood 1953, 8, 459
- 150 - TRUHAUT (R.), GOSSE (Ch.) de LESDAIN (N.), PAOLETTI (CI.) - Sur le dosage du fer et de la capacité latente de fixation de ce métal dans le plasma sanguin par la terpyridine. Application au dosage du fer dans le sang et dans les organes.
Ann. Biol. Clin. 1959, 17, 571
- 151 - URIEL (J.) - Interaction entre les protéines sériques et des cations métalliques.
Thèse Sc. Paris 1959
- 152 - URIEL (J.) - Interaction des protéines sériques et des cations métalliques. Activité précipitante de quelques métaux sur les protéines sériques séparées par électrophorèse en gélose.
Biol. Med. 1961, 50, 27
- 153 - VINCENT (P.C.) - The effects of heavy metal ions on the human erythrocyte. III. Inhibition of the effects of lead and mercury.
Austr. J. exper. Biol. Med. Sc. 1959, 37, 83
- 154 - VINCENT (P.C.), BLACKBURN (C.R.S.) - The effects of heavy metal ions on the human erythrocyte. I. Comparison of the action of several heavy metals.
Austr. J. exper. Biol. Med. Sc. 1958, 36
- 155 - WALTNER (K.), CSERNOVSZKY (M) - Effects of metal salts on the electrolyte content of human red blood cells
Clin. Chim. Acta 1960, 5, 230
- 156 - WARNER (R.C.), WEBER (I.) - The metal combining properties of conalbumin.
J. Am. Chem. Soc. 1953, 75, 5094

- 157 - WEILL (J.P.), METAIS (P.), - Influence des chélateur (EDTA calcique) sur le dosage du fer sérique et du fer urinaire.
Sem. Hôp. (Pathol. Biol.) 1959, 7, 437
- 158 - WEITZEL (G.), FRETZDORFF (A.M.) - Zinc-Imidazol-Verbindungen Ztsch. physiol. Chem. 1956, 205, 1
- 159 - WELCHER (F.J.) - The analytical uses of ethylenediamine tetraacetic acid.
D. van Nostrand C^o. Inc. Princeton, New-Jersey 1958.
- 160 - WILBRANDT (W.) - Die Wirkung von Schwermetallsalzen auf die erythrocyten permeabilität für glycerin.
Pflügers Archiv. 1940-41, 244, 637
- 161 - WILBRANDT (W.) - Permeability and transport systems in living cells.
J. Pharm. Pharmacol. 1959, 11, 65
- 162 - WÖHLER (F.) - Über die Natur des Hämosiderins.
Acta haematol. 1960, 23, 342
- 163 - WÖHLER (F.), SCHONLAU (F.) - Über das Vorkommen von Ferritin in serum.
Klin. Wschr. 1959, 37, 445
- 164 - WUHRMANN (F.), JASINSKI (B.) - Untersuchungen über die binding des Eisens an das Serumglobulin B1 mit Hilfe des Radioeisens und dessen klinische Bedeutung.
Schw. Med. Wschr. 1953, 83, 661
- 165 - ZAK (B.) - Simple procedure for the single sample determination of serum copper and iron.
Clin. Chim. Acta 1958, 3, 328

FACULTE DE PHARMACIE
UNIVERSITE DE NANCY

T H E S E

présentée par : Claude-Georges BLIN

né le : 14 octobre 1933 à MEZIERES (Ardennes)

nationalité : française

et portant le titre : Affinités de l'ion ferrique pour des substrats biologiques. Comparaison avec d'autres cations.

VU
NANCY, 1e 26 février 1962
Le Président de Thèse,
S. BESSON

VU et APPROUVE
NANCY, 1e 28 février 1962
Le Doyen de la Faculté,
A. BERNANOSE

VU et PERMIS d'imprimer
NANCY, 1e 2 mars 1962
Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université
P. IMBS

Achevé d'imprimer
par
Les Etablissements Jacques Vadebourg
42, rue Dombasle Paris 15^e
au cours
du 4^{ème} trimestre 1963

La composition de ce volume a été
effectuée à la machine à écrire
par frappe directe sur
CLICHES PAPIER
et l'impression réalisée en
O F F S E T

